



Mónica Alexandra Ferro da Silva

Licenciada em Ciências de Engenharia Biomédica

Estudo e Desenvolvimento do método de detecção de metabolitos no fluido lacrimal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Valentina Vassilenko, Prof. Auxiliar,
FCT/UNL

Co-orientador : Prof. Dr. João O'Neill, Prof. Catedrático,
FCM/UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Mário António Basto Forjaz Secca

Arguente: Prof. Doutor Mário Emanuel Campos de Sousa Diniz

Vogais: Prof.^a Doutora Valentina Borissovna Vassilenko

Prof. Doutor João Erse de Goyri O'Neill



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Outubro, 2012

Estudo e Desenvolvimento do método de detecção de metabolitos no fluido lacrimal

Copyright © Mónica Alexandra Ferro da Silva, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*Aos meus pais, avós e irmã, pelo grande exemplo de amor.
À minha querida avó Natália, que tanto orgulho teria em
presenciar este momento.*

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Professora Valentina por todo o tempo e atenção dedicados, pela disponibilização do equipamento e pela simpatia e paciência sempre demonstradas.

Em segundo lugar, quero também agradecer ao Professor João O'Neill pela sua disponibilidade em colaborar neste estudo, e também pela sua paciência e simpatia.

À Helena Ferreira, por todo o tempo que me dedicou, pela sua paciência, pelas suas explicações, pela sua simpatia e delicadeza e por toda a ajuda, que tão preciosa foi, durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. João Lourenço, do Departamento de Informática da FCT/UNL pelo tempo disponibilizado e por toda a paciência demonstrada na explicação das minhas dúvidas em *LaTeX*.

A todos os meus colegas nesta jornada da tese, por todas as sugestões e por toda a ajuda.

Aos meus pais, por todo o tempo, paciência, amor, carinho, compreensão e recursos que disponibilizaram nesta longa etapa que termina com a realização deste trabalho.

À minha irmã, por todo o carinho demonstrado, pelos incentivos e conselhos que sempre me deu.

Aos meus avós que sempre me incentivaram e que são, para mim, um grande exemplo de vida.

Aos meus amigos destes 5 anos e aos amigos de sempre, que fizeram do meu percurso académico o melhor tempo da minha vida. Obrigado pelos sorrisos e por todo o apoio e por terem contribuído, de tantas formas, para o que hoje sou.

Ao N42E, que tão essencial foi nos últimos meses desta caminhada.

À TunaMaria, por todos os bons momentos e por tudo o que aprendi neste grupo formado por pessoas tão diferentes. Um agradecimento especial à Flor, por ter sempre acreditado em mim e à Colibri e Pírilim, que me apresentaram a este maravilhoso grupo e mundo das tunas.

*" Encontrei uma preta
que estava a chorar,
pedi-lhe uma lágrima
para a analisar.
Recolhi a lágrima
com todo o cuidado
num tubo de ensaio
bem esterilizado.
Olhei-a de um lado,
do outro e de frente:
tinha um ar de gota
muito transparente.
Mandeí vir os ácidos,
as bases e os sais,
as drogas usadas
em casos que tais.
Ensaiei a frio,
experimentei ao lume,
de todas as vezes
deu-me o que é costume:
Nem sinais de negro,
nem vestígios de ódio.
Água (quase tudo)
e cloreto de sódio."
António Gedeão*

Resumo

Associadas ao aumento crescente da obesidade mundial encontram-se diversas patologias tais como a diabetes mellitus, a hipertensão, a resistência insulínica, a disfunção endotelial e, em último caso, doenças cardiovasculares. À problemática destas doenças para a saúde da população acrescem-se ainda os custos financeiros associados ao diagnóstico e tratamento das mesmas e ainda o desconforto para o próprio paciente.

Actualmente, a avaliação destas patologias é feita através da análise de matrizes biológicas recolhidas com recurso a métodos invasivos.

Assim sendo, este trabalho teve como objectivo estudo e desenvolvimento de uma técnica não-invasiva, mais rápida, de baixo custo e indolor para o paciente que servirá para uma futura avaliação de diversas patologias através da análise de metabolitos voláteis presentes no fluido lacrimal através da técnica de Espectrometria de Mobilidade Iónica acoplada a uma coluna multicapilar (MCC-IMS). O presente estudo foi efectuado como “prova de conceito”, uma vez que se trata de um estudo pioneiro a nível internacional.

Para tal, foi desenvolvido o protocolo e efectuada a recolha da lágrima de 9 indivíduos com patologia e 9 de controlo. Após a recolha, foi realizada uma análise dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes na lágrima servindo as amostras para avaliação da eficácia do método em estudo. Com o objectivo da familiarização com a técnica foi, inicialmente, realizado um workshop teórico-prático intitulado “Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iónica no contexto de análise de ar exalado”.

Este trabalho foi realizado em colaboração com a Faculdade de Ciências e Tecnologia da UNL, Faculdade de Ciências Médicas da UNL e NMT, S.A.

Os resultados foram apresentados numa comunicação em painel na conferência iMed 4.0 na FCM/UNL. Esta tese originou um artigo aceite para publicação e apresentação oral na conferência Biostec 2013 e está também em preparação um artigo a submeter para publicação no International Journal of Ion Mobility Spectrometry.

Palavras-chave: MCC-IMS, diabetes mellitus, espectrometria de mobilidade iónica, lágrima

Abstract

Obesity is one of the major health issues in the actual world. Associated with obesity there are several pathologies such as diabetes *mellitus*, hypertension, insulin resistance, endothelial dysfunction and, ultimately, cardiovascular diseases. In addition to these health problems, there are financial costs related to their diagnostic and treatment and also, the discomfort for the patient.

Currently, the evaluation of these diseases is done through the analysis of biological matrices obtained by invasive methods, such as blood analysis.

Therefore, this study aimed to study and develop a non-invasive technique, fast, inexpensive and painless to the patient who will serve to further evaluation of various diseases through the analysis of volatile metabolites present in the tear fluid through the technique of ion mobility spectrometry coupled to a column multicapilar (MCC-IMS). The present study was conducted as a "proof of concept", since it is a pioneering study internationally.

For this propose, the protocol was developed and performed to collect the tear of 9 patients with pathology and 9 patients of control. After the collection, we performed an analysis of volatile organic compounds (VOCs) present in the tear serving samples to assess the efficacy of the method being studied.

A workshop entitled as *Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iônica no contexto de análise de ar exalado* was initially performed to familiarize the students with the IMS technique.

This work was performed in collaboration with the Faculdade de Ciências e Tecnologia, UNL, Faculdade de Ciências Médicas, UNL and NMT, SA.

The results were presented in a communication panel at the conference iMed 4.0 FCM / UNL. This thesis originated an article accepted for publication and oral presentation at the conference Biostec 2013 and it is also in preparation another article to submit for publication in the International Journal of Ion Mobility Spectrometry.

Keywords: MCC-IMS, diabetes mellitus, ion mobility spectrometry, tear ...

Conteúdo

1	Introdução	1
2	Conceitos teóricos	3
2.1	A obesidade	3
2.2	O pâncreas, a glucose e a insulina	5
2.2.1	O pâncreas	5
2.2.2	A glucose	6
2.2.3	A insulina	9
2.3	A resistência insulínica	10
2.4	A Diabetes <i>Mellitus</i>	12
2.4.1	Contexto histórico	12
2.4.2	Patofisiologia da diabetes tipo 1	12
2.4.3	Patofisiologia da diabetes tipo 2	13
2.5	O Síndrome Metabólico	14
2.6	A disfunção endotelial	15
2.7	A análise da lágrima	16
2.8	Biomarcadores associados à Diabetes	17
3	Técnicas de Caracterização de VOCs	19
3.1	A Espectrometria de Mobilidade Iónica	19
3.1.1	Descrição do princípio físico	19
3.1.2	A fonte de ionização e a formação de iões reactivos positivos e negativos	21
3.1.3	Formação dos iões-produto e as polarizações positiva e negativa	23
3.1.4	A mobilidade dos iões	24
3.1.5	Os limites de detecção	24
3.1.6	O MCC-IMS	25
3.2	Outras técnicas de análise	29
3.2.1	GC-MS	29

3.2.2	SIFT-MS	30
3.2.3	PTR-MS	31
4	Materiais e Metodologia	33
4.1	Material Utilizado	33
4.2	Metodologia	34
4.2.1	Recolha da amostra	34
4.2.2	Caracterização dos grupos em estudo	35
4.2.3	Análise da amostra	35
4.2.4	Análise da insulina humana anidra Insulatard Penfill 100 IU/ml (Novo Nordisk) [®]	39
5	Resultados e Discussão	41
5.1	Aquisição de Dados - O Software LAV [®]	41
5.2	Definição da Matriz Biológica e Tratamento de Dados	45
5.2.1	Definição da Matriz Biológica	45
5.2.2	Avaliação do espectro da insulina	48
5.2.3	Tratamento de Dados	49
5.3	Resultados e Discussão de Resultados	50
5.3.1	Cálculo dos valores de mobilidade reduzida	51
5.3.2	Resultados em função da intensidade dos picos	53
5.3.3	Diferença percentual entre as intensidades dos picos seleccionados	57
6	Conclusões	61
7	Anexo 1	69
8	Anexo 2	71
9	Anexo 3	73

Lista de Figuras

2.1	Anatomia do pâncreas	5
2.2	Tipos de células pancreáticas	6
2.3	Estrutura da glucose	6
2.4	Estrutura do glicogénio	8
2.5	Estrutura da insulina	9
3.1	Princípio físico do IMS	20
3.2	Exemplo de um espectro de intensidade e tempo de retenção obtido através de MCC-IMS	21
3.3	Exemplo de um espectro obtido através de MCC-IMS	21
3.4	Esquema interno do aparelho MCC-IMS	26
3.5	Posições da válvula do MCC-IMS	27
3.6	Janela <i>Spectra</i>	28
3.7	Esquema do sistema GC-MS	29
3.8	Esquema do sistema SIFT-MS	31
3.9	Esquema do sistema PTR-MS	31
4.1	Localização das glândulas e canais lacrimais	34
4.2	Esquema da montagem experimental	36
4.3	Espectro da análise da insulina em modo positivo	38
4.4	Espectro da análise da insulina em modo negativo	38
5.1	Visualização em simultâneo de um espectro (mapa de cores) e de um espectro individual correspondente ao spectra 34 (tempo de retenção de 7,623 segundos)	42
5.2	Visualização em simultâneo do mesmo espectro (mapa de cores) e de um espectro individual correspondente ao spectra 131 (tempo de retenção de 30,030 segundos)	42
5.3	Janela do <i>software</i> LAV [®]	43

5.4	Imagem de um espectro de uma amostra e respectivo <i>Areaset</i>	44
5.5	Espectro da análise do papel de recolha e respectivo <i>Areaset</i>	45
5.6	Espectro da análise de lágrima e respectivo <i>Areaset</i>	46
5.7	Espectro da análise da insulina e respectivo <i>Areaset</i>	48
5.8	Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 (direito).	53
5.9	Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 (esquerdo)	53
5.10	Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 (direito).	53
5.11	Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 (esquerdo)	53
5.12	Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 (direito).	54
5.13	Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 (esquerdo)	54
5.14	Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 (direito).	54
5.15	Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 (esquerdo)	54
5.16	Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 (direito).	54
5.17	Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 (esquerdo)	54
5.18	Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 nos olhos esquerdo e direito.	56
5.19	Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 nos olhos esquerdo e direito.	56
5.20	Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 nos olhos esquerdo e direito.	56
5.21	Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 nos olhos esquerdo e direito.	56
5.22	Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 nos olhos esquerdo e direito.	57

Lista de Tabelas

2.1	Critérios para a definição do Síndrome Metabólico	14
2.2	Biomarcadores da Diabetes (análise sanguínea)	17
3.1	Características do MCC-IMS	27
3.2	Função de cada parâmetro do MCC-IMS	28
3.3	Dimensões do MCC-IMS	29
4.1	Material Utilizado na Realização dos Testes	34
4.2	Características de funcionamento do programa EXP2_10MIN	36
4.3	Parâmetros de Análise	36
5.1	Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos da matriz biológica	47
5.2	Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos da insulina	49
5.3	Picos escolhidos para análise	50
5.4	Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de controlo	51
5.5	Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de diabéticos (olho direito)	52
5.6	Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de diabéticos (olho esquerdo)	52
5.7	Diferença percentual de intensidades para o pico I8	57
5.8	Diferença percentual de intensidades para o pico I16	58
5.9	Diferença percentual de intensidades para o pico I18	58
5.10	Diferença percentual de intensidades para o pico I27	59
5.11	Diferença percentual de intensidades para o pico I28	59
5.12	Diferença percentual entre os olhos direito e esquerdo	60

Lista de Acrónimos

C - grupo de controlo
D_n - indivíduo diabético n (onde n varia de 1 a 9)
D.P. - diferença percentual
E - campo eléctrico
E1 - fluxo do gás de deriva
E2 - fluxo do gás de arraste
EPC1 - controlador de pressão electrónico do gás de deriva
EPC2 - controlador de pressão electrónico do gás de arraste
EXP2_10MIN - modo de operação do aparelho para a análise de amostras
GC - cromatografia gasosa
GC-MS - espectrometria de massa com cromatografia gasosa
GLUT - transportador de glucose
HDL - lipoproteína de alta densidade
HISS - substância hepática sensibilizadora de insulina
IDF - Federação Internacional da Diabetes
I_n - pico n do espectro de insulina (n varia de 1 a 28)
IL-6 - interleucina-6
IMC - índice de massa corporal
IMS - espectrometria de mobilidade iónica
K - mobilidade iónica
K₀ - mobilidade reduzida
LAV - software de gestão e interpretação dos espectros
l_d - comprimento do tubo de deriva
LDL - lipoproteína de baixa densidade
MCC - coluna multicapilar
MCC-IMS - espectrometria de mobilidade iónica com coluna multicapilar
MS - espectrometria de massa
m/z -relação massa/carga
NO - óxido nítrico

P -bomba

P_n - pico n do espectro do papel (onde n varia de 1 a 10)

P₀ - pressão ambiente

P_d - pressão no tubo de deriva

ppb - partes por bilião

ppt - partes por trilião

PTR-MS - espectrometria de massa com reacção de transferência de protões

R - gravação do espectro

RIP - pico de iões reactivos

RIST - teste de sensibilidade à insulina de acção rápida

S - área de análise de substâncias

SIFT-MS - espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões

T_d - temperatura do tubo de deriva

T₀ - temperatura ambiente

t_d - tempo de deriva

t_{dcor} - tempo de deriva corrigido

t_r - tempo de retenção

T1 - temperatura do IMS

T2 - temperatura da MCC

T3 - temperatura da válvula

T4 - temperatura do *sample loop*

T5 - temperatura do tubo aquecido entre a MCC e o *sample loop*

T6 - temperatura do tubo de inserção da amostra

TNF- α - factor de necrose tumoral α

UDP - uridina difosfato

V - válvula

v_d - velocidade de deriva

VLDL - lipoproteína de muito baixa densidade

VOC - composto orgânico volátil

$\Delta\tau$ - tempo de abertura da grelha



Introdução

A comunidade médica sabe, hoje em dia, que a chave para o aumento da taxa de sobrevivência não se encontra apenas relacionada com um método de tratamento eficaz das doenças mas também com um diagnóstico precoce das mesmas.

No sentido do melhoramento e aumento dos tratamentos médicos, grandes avanços tecnológicos se têm verificado. Contudo, o mesmo não acontece com os meios de diagnóstico de doenças que em fase inicial são assintomáticas, como é o caso da diabetes, hipertensão e cancro pulmonar, por exemplo.

No caso do cancro sabe-se que a taxa de sobrevivência está intimamente relacionada com a detecção precoce da doença pois este diagnóstico prematuro possibilita a cura total do mesmo[1].

No caso da diabetes, a questão fulcral não se prende apenas com o diagnóstico precoce mas também com a sua monitorização e controlo.

O controlo da diabetes é, actualmente, realizado com recurso a análises sanguíneas de avaliação do nível da glicémia, invasivas e desconfortáveis para o paciente[2]. Nesse sentido, torna-se essencial a existência de um método de controlo eficaz, rápido, de baixo custo e que, acima de tudo, seja indolor para o paciente. A análise do fluido lacrimal reúne estas características.

A análise da lágrima permite obter uma quantidade de informação relevante acerca do organismo de cada indivíduo, através dos compostos orgânicos voláteis (VOCs) presentes nesta matriz biológica, relacionando a variação de concentração dos diversos compostos com o estado de saúde do paciente[3].

Actualmente esta análise não é usada de forma recorrente na prática clínica uma vez que existe ainda muita falta de informação acerca da origem e do significado dos compostos detectados e também porque o método de recolha e análise ainda não se encontra

uniformizado. Diversos métodos de recolha e análise da lágrima foram já abordados pela comunidade científica[3], porém, o método seleccionado como objecto de estudo neste trabalho apresenta sobre outros a vantagem de ser mais simples.

O objectivo deste trabalho é o estudo e desenvolvimento da técnica de detecção de metabolitos no fluido lacrimal para futura utilização como método de controlo da glicémia na diabetes.

A técnica seleccionada e utilizada foi a Espectrometria de Mobilidade Iónica acoplada a uma coluna multicapilar, técnica esta que possui elevada sensibilidade e limites de detecção muito baixos[4].

Com o objectivo da familiarização com esta técnica, foi realizado um *workshop* com o título *Introdução à Espectrometria de Mobilidade Iónica no contexto de análise de ar exalado* em que o objectivo era comparar os espectros do ar exalado de indivíduos fumadores: antes de fumar, depois de fumar um cigarro electrónico e depois de fumar um cigarro convencional.

Esta dissertação foi dividida em 6 capítulos. No capítulo 2 abordam-se os diversos aspectos metabólicos que conduzem ao aparecimento da diabetes. No capítulo 3, explora-se o princípio físico da técnica e faz-se uma comparação da mesma com outras técnicas já abordadas cientificamente. No capítulo 4 é apresentada toda a instrumentação do MCC-IMS bem como a metodologia adoptada neste trabalho. O tratamento e discussão de resultados é alvo de atenção no capítulo 5 sendo o capítulo 6 dedicado às conclusões finais deste estudo e perspectivas futuras.

Deste trabalho resultou ainda uma comunicação em painel apresentada na conferência iMed 4.0, organizada pela Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Nova de Lisboa e que foi realizada nos dias 19, 20 e 21 de Outubro de 2012 e um artigo científico aceite para publicação oral na conferência Biostec 2013. Está ainda em preparação um outro artigo para publicação no *International Journal of Ion Mobility Spectrometry*.



Conceitos teóricos

2.1 A obesidade

Segundo estatísticas do Observatório Nacional da Obesidade e do Controlo do Peso, os indivíduos mais afectados pela obesidade em Portugal têm idades compreendidas entre os 50 e os 64 anos, com uma prevalência que se situa entre os 20% e os 25%. [5]

A obesidade é caracterizada por um excesso de massa de tecido adiposo e pode resultar de uma transição nutricional para uma dieta mais ocidentalizada, mais rica em gorduras, açúcares e alimentos refinados e pobre em carboidratos complexos e fibras aliada à sedentarização. [6]

Este aumento de tecido adiposo resulta num aumento da morbilidade e mortalidade dado que a obesidade é um factor de risco para doenças como diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares, resistência insulínica e ainda doenças ósseas e articulares.

Porém, a obesidade não é resultado de um só factor. Deriva da combinação de diversas condições como a ingestão de lípidos, a frequência alimentar e, tal como referido anteriormente, a prática de exercício físico. Acredita-se também que factores genéticos estejam associados à obesidade, embora alguns mecanismos ainda se encontrem por esclarecer [7].

Algumas desordens endócrinas tais como o hipotireoidismo também conduzem à obesidade, embora representem uma diminuta percentagem dos casos.

Associada à obesidade surge a disfunção metabólica que resulta da exposição das células do tecido adiposo ao excesso de nutrientes. Tal acontece porque o tecido adiposo representa o maior depósito de nutrientes que ainda não foram utilizados como, por exemplo, a glucose e os lípidos. O excesso de nutrientes e a obesidade conduzem, por exemplo, à resistência insulínica e à hipertensão arterial que, por sua vez, são alguns dos

factores que combinados levam à disfunção metabólica.[8]

O tecido adiposo representa cerca de 20% do peso corporal, sendo constituído por adipócitos (constituente maioritário, representa cerca de 50% do tecido adiposo), tecido nervoso, fibras de colagénio, nódulos linfáticos, macrófagos, leucócitos, fibroblastos e pré-adipócitos.[9]

Este tecido está distribuído entre os compartimentos subcutâneo e visceral (a nível torácico e abdominal). Existem ainda alguns adipócitos na pele, timo, medula óssea, glândulas parótida, paratiróide e pâncreas.

Podem ainda distinguir-se dois tipos de tecido adiposo[10]: o castanho e o branco.

O tecido adiposo castanho está relacionado com a termorregulação pois tem a capacidade de dissipar as reservas energéticas sob a forma de calor.

O tecido adiposo branco, quando maduro, armazena os triglicéridos e a sua principal função é formar uma protecção mecânica, amenizando o impacto de choques e permitindo um adequado deslizamento dos feixes musculares uns sobre os outros. Além disto, os adipócitos produzem péptidos, hormonas e citocinas com capacidade de modular o estado inflamatório, que é responsável pelo desenvolvimento de patologias como a resistência insulínica, a diabetes tipo 2 e a aterosclerose. O excesso de nutrientes presentes em obesos causa um aumento da concentração bacteriana do tracto digestivo, o que, por sua vez, conduz a um estado inflamatório. Mais ainda, o excesso de ácidos gordos livres saturados e mono-saturados também leva a um aumento do estado inflamatório, apesar de estas vias metabólicas ainda não estarem completamente esclarecidas.[11]

A distribuição anatómica destes tecidos é geneticamente dependente, mas depende também da idade, sexo, temperatura ambiental e estado nutricional.

O aumento de massa gorda manifesta-se pelo aumento do conteúdo intracelular de lípidos com aumento do tamanho e número dos adipócitos.

Existe uma proteína que se considera também associada à obesidade: a leptina. A leptina é constituída por uma cadeia polipeptídica de 167 aminoácidos, expressa principalmente pelos adipócitos e libertada no sangue em proporção com a quantidade de tecido adiposo existente. Actua no Sistema Nervoso Central diminuindo o apetite, causando assim diminuição do peso corporal e aumentando também o gasto energético.[12]

Um dos métodos utilizados para aferir acerca da obesidade é o índice de masa corporal, IMC (ou BMI, do inglês *body mass index*), que é descrito pela relação $\text{peso(kg)}/\text{altura}^2(\text{m}^2)$.

Diz-se que um indivíduo é normal se o seu IMC estiver compreendido entre 20 e 25. Caso o IMC esteja entre 26 e 30, diz-se que um indivíduo tem excesso de peso e para um IMC superior a 30, o indivíduo é considerado obeso. Ainda, para um mesmo valor de IMC, sabe-se que as mulheres possuem mais gordura do que os homens.[7]

Constata-se também que as maiores complicações associadas à obesidade estão maioritariamente relacionadas com a gordura intra-abdominal.

A resistência insulínica e a hiperinsulinémia são consideradas como as principais componentes de um conjunto de desordens metabólicas, o qual se denomina por Síndrome Metabólico e o qual abordaremos mais tarde.

2.2 O pâncreas, a glucose e a insulina

2.2.1 O pâncreas

O pâncreas é um órgão glandular que apresenta uma forma alongada e cônica e está situado transversalmente na parte superior da cavidade abdominal. É possível distinguir três segmentos distintos no pâncreas: a cabeça, que corresponde à porção mais larga, orientada para a direita e adjacente ao duodeno, para onde desaguam as suas secreções digestivas; o corpo, que corresponde à porção central e mais extensa, a qual cruza a cavidade abdominal até à esquerda, por trás do estômago e à frente da coluna vertebral; a cauda, que corresponde à porção mais fina e estreita e que se prolonga até à parte esquerda do abdômen, próximo do baço[13].

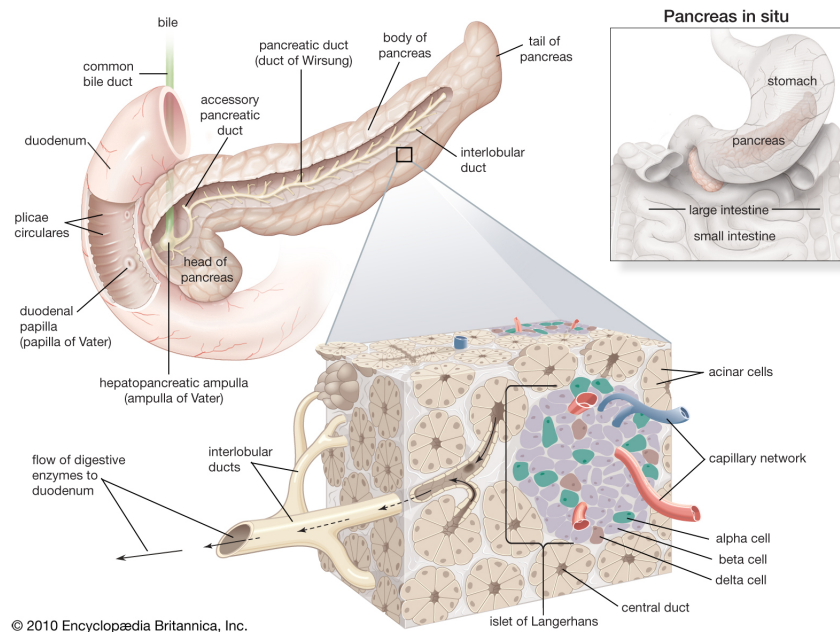


Figura 2.1: Anatomia do pâncreas [14]

É irrigado pelas artérias esplênica e pancreatoduodenal superior e inferior. A sua drenagem é efectuada para as veias mesentérica e esplênica, que se unem na parte posterior ao colo do pâncreas, para formar a veia portal hepática. No plano anterior ao pâncreas encontra-se o estômago e à sua esquerda encontra-se o baço.[15]

Microscopicamente, distinguem-se dois tipos de tecidos: um tecido mais claro (Ilhotas de Langerhans), que corresponde à porção endócrina do pâncreas que segrega hormonas que regulam os níveis de glucose no sangue e um tecido circundante mais escuro que corresponde à porção exócrina do pâncreas e que produz hormonas que contribuem para a digestão.

Nas Ilhotas de Langerhans podem encontrar-se quatro tipos de células, classificados de acordo com a sua função[16]:

- células β , produtoras de insulina. Reduzem a taxa de glucose no sangue.

- células α , produtoras de glucagon. Aumentam a taxa de glucose no sangue.
- células δ , produtoras de somatostatina. Inibem o pâncreas endócrino.
- células PP, produtoras de um polipéptido pancreático que inibe o pâncreas exócrino.

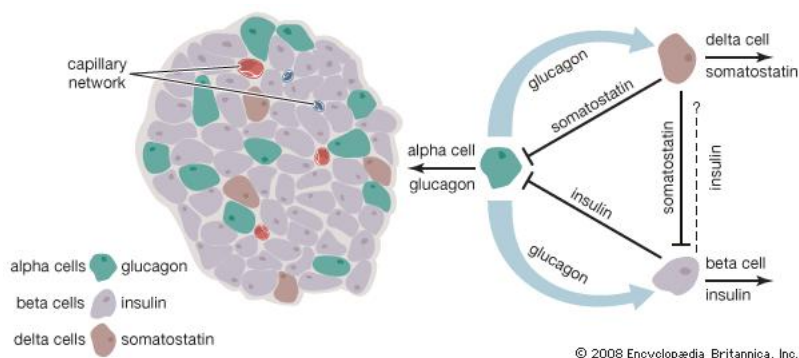


Figura 2.2: Tipos de células pancreáticas[14]

O pâncreas exócrino liberta dois tipos de secreções:

- iões bicarbonato, produzidos por células centroacinares.
- enzimas digestivas (amilase pancreática, tripsina e quimiotripsina), produzidas por células basófilas.

2.2.2 A glucose

A glucose foi isolada pela primeira vez, a partir de passas de uva, em 1747 por Andreas Marggraf, mas só em 1838 Jean Dumas inventou o nome glucose, que provém da palavra grega para açúcar, *glycos*.

A sua estrutura foi descoberta na década de 1890, por Emil Fischer.

A glucose é um monossacarídeo pequeno, polar e solúvel em água. O seu papel é de importância vital sob o ponto de vista fisiológico porque é a fonte nutricional dos neurónios e porque possui várias vias metabólicas como, por exemplo, a glicólise e a via das pentoses-fosfato.[17]

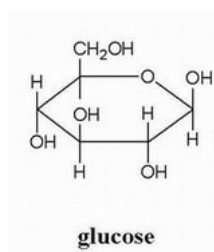


Figura 2.3: Estrutura da glucose [18]

A sua regulação é efectuada por hormonas maioritariamente provenientes do pâncreas, sendo as duas mais importantes a insulina e o glucagon.

Após a digestão, sabe-se que, no sangue, não se encontra apenas presente glucose mas também outros carboidratos como a frutose e a galactose. Porém, grande parte destes são rapidamente convertidos em glucose no fígado através de interconversões entre os monossacarídeos.

Para que possa ser utilizada pelas células, a glucose tem que ser primeiramente transportada para o interior das mesmas. Dado que a glucose é uma molécula com peso molecular superior ao que as membranas lipídicas conseguem transportar por difusão directa, a sua difusão ocorre com auxílio de moléculas transportadoras, processo esse que é designado por difusão facilitada.[17]

A taxa de transporte de glucose é directamente influenciada pela presença de insulina. A presença de insulina na corrente sanguínea aumenta a taxa de transporte de glucose para o interior das células e sabe-se que, perante a ausência de insulina, a quantidade de glucose que se difunde para o interior das células é muito inferior à quantidade necessária para o metabolismo energético normal das células.

Após a entrada de glucose nas células ocorre a sua fosforilação, cujo principal objectivo é manter a glucose no meio intracelular, por acção de uma enzima, a *glucoquinase* (no fígado) e a *hexoquinase* (nas restantes células) originando-se, assim, glucose-6-fosfato. Esta fosforilação é praticamente irreversível na maioria das células, com excepção das células hepáticas, das células do epitélio intestinal e do epitélio tubular renal que possuem uma enzima, a *glucose fosfatase*, que quando activada, consegue reverter a reacção de fosforilação.

Dentro das células, a glucose pode ser armazenada sob a forma de glicogénio ou pode ser utilizada para libertação imediata de energia. Uma das formas de utilização da glucose para libertação de energia é a respiração aeróbia, processo através do qual se produz ATP, a molécula que fornece energia às células e que participa no transporte activo.

Do ponto de vista do armazenamento, todas as células conseguem armazenar pequenas quantidades de glicogénio, porém, só as células hepáticas e as musculares têm a capacidade de armazenar largas quantidades do mesmo.

A razão pela qual a glucose é armazenada sob a forma de glicogénio prende-se com a pressão osmótica intracelular. O glicogénio pode ser armazenado sob a forma de um polímero com elevado peso molecular, formando-se um precipitado, não causando assim alterações significativas da pressão osmótica. O mesmo não aconteceria com a glucose pois, por ser um monossacarídeo de baixo peso molecular e solúvel, ao ser armazenada em elevadas quantidades causaria variações na pressão osmótica.[17]

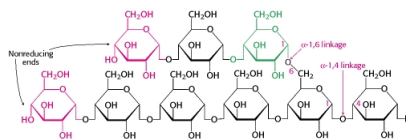


Figura 2.4: Estrutura do glicogénio [19]

O processo de formação de glicogénio denomina-se por glicogénese e consiste em três reacções principais[16]:

- Conversão de glucose-6-fosfato em glucose-1-fosfato;
- Conversão da glucose-1-fosfato em UDP-glucose;
- Adição da UDP-glucose a uma molécula de glicogénio.

A UDP-glucose consegue doar glucose à extremidade 4' da molécula de glicogénio, sendo esta reacção catalisada pela enzima *glicogénio-sintase*. Esta enzima só adiciona glucose a glicogénio já formado, pelo que existe outra enzima envolvida no processo de iniciação de uma nova cadeia de glicogénio, a *glicogenina*.

A *glicogenina* inicia a formação de uma nova molécula de glicogénio pela adição de uma molécula de UDP-glucose ao grupo hidroxilo da tirosina da *glicogenina*, adição esta que é catalisada pela *glicosiltransferase* da própria *glicogenina*. A cadeia é, então, prolongada através da adição de mais seis resíduos de glucose (provenientes da UDP-glucose) dando origem à cadeia de iniciação. Esta cadeia pode depois ser prolongada pela *glicogénio sintase* porque já está formada a cadeia inicial.[16]

Em situações de actividade, a célula utiliza o glicogénio armazenado como fonte de glucose. Para que tal aconteça, é necessária a degradação do glicogénio em glucose. Este processo tem o nome de glicogenólise e não é o processo inverso da glicogénese.

A glicogenólise é o processo de ruptura da molécula de glicogénio para formação de glucose.

Na glicogenólise, cada molécula de glucose sucessiva em cada ramo de glicogénio é dividida por fosforilação, através da enzima *fosforilase*, que se encontra inactiva em situações de repouso e que pode ser activada pela epinefrina e pelo glucagon. Estas hormonas promovem a formação de AMP cíclico que dá início à cascata de reacções que activam a *fosforilase*. [16]

O glucagon activa a *adenil ciclase* na membrana das células hepáticas, conduzindo à formação de AMP cíclico. Este, activa a *proteína reguladora da proteína quinase*, que por sua vez, activa a *proteína quinase*. A *proteína quinase* activa a *fosforilase b* que é depois convertida em *fosforilase a* promovendo, assim, a degradação do glicogénio em glucose-1-fosfato que é, então, desfosforilada e libertada.[16]

2.2.3 A insulina

A sequência primária da insulina foi descoberta por Sanger em 1955, sendo que a sua estrutura tri-dimensional só foi publicada em 1969 por Hodgkin. Enquanto isto, em 1967, Steiner descobriu a proinsulina. Em 1980, Bell descobriu a sequência do gene humano que codifica a insulina.[20]

Em 1971, Freychet deduziu a presença de receptores celulares da insulina. Estes foram, pela primeira vez, isolados em 1972 por Cuatrecasas. Em 1979, Doniach e Bottazzo descobriram os anticorpos das células da ilhotas de Langerhans. Foi também neste ano que se produziu insulina sintética.[20]

A insulina é um polipéptido composto por 51 aminoácidos e é responsável pela regulação do nível de glucose no sangue. A insulina induz o aparecimento de receptores de glucose na membrana das células, fazendo com que a glucose seja transportada para o citoplasma.

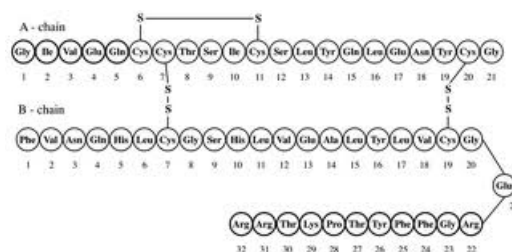


Figura 2.5: Estrutura da insulina [21]

A libertação de insulina no sangue ocorre através das células β do pâncreas em resposta aos níveis crescentes de glucose no sangue. A insulina possibilita que a maioria das células absorvam a glucose e a utilizem como fonte de energia. É também o principal sinal de controlo para a síntese de glucose em glicogénio para armazenamento interno nas células hepáticas e musculares. Níveis reduzidos de glucose resultam em reduzidos níveis de secreção de insulina e na conversão de glicogénio em glucose.

Quando há uma falha na produção de insulina, tem-se como resultado elevados níveis de glucose no sangue, pois a mesma não consegue difundir-se para o meio intracelular.

A meia vida plasmática da insulina é cerca de 6 minutos, o que significa que esta é eliminada da corrente sanguínea, na sua maioria, dentro de 10 a 15 minutos após a sua libertação. A insulina que não é utilizada é degradada pela enzima *insulinase*. [16]

Esta hormona não apresenta apenas efeitos sobre a glucose. Induz também efeitos a nível membranar, tornando a membrana plasmática mais permeável a aminoácidos, iões potássio e iões fosfato. Além disto, modifica também os níveis de actividade de várias enzimas, alterando principalmente o seu estado de fosforilação. Promove, ainda, a síntese e armazenamento de proteínas por estimular o transporte de muitos aminoácidos para o interior das células. [16]

A quantidade de insulina que é secretada depende da concentração de glucose-6-fosfato no meio intracelular. As células β possuem transportadores de glucose (GLUT-2) que permitem um influxo da mesma. Dentro das células, esta glucose é fosforilada a glucose-6-fosfato que, posteriormente, é oxidada para formar ATP, inibindo os canais de potássio e abrindo os canais de cálcio dependentes de voltagem, produzindo um influxo de íons de cálcio. Isto faz com que as vesículas que contêm insulina se fundam com a membrana celular, sendo então secretada a insulina, por exocitose.[16]

A secreção de insulina pode ser inibida pela acção de somatostatina que age dentro das próprias Ilhotas de Langerhans.

A ausência da produção de insulina pelas células β conduz à Diabetes Mellitus Tipo 1 e a resistência aos efeitos metabólicos da mesma conduz à Diabetes Mellitus Tipo 2.

2.3 A resistência insulínica

Como já falado anteriormente, a obesidade, a falta de exercício físico e também a predisposição genética podem causar uma diminuição da tolerância à glucose, conduzindo à Diabetes Mellitus Tipo 2.

Podem também levar à diminuição da sensibilidade à insulina provocando, deste modo, o desenvolvimento da Resistência Insulínica.

A Resistência Insulínica define-se como uma resposta biológica insuficiente à insulina endógena ou exógena.[22]

Na prática clínica diária pode ser avaliada pela relação glucose e insulina em jejum ou em condições pósprandiais (após a refeição) e ainda pela determinação da insulinemia em jejum (com excepção dos diabéticos que façam terapia com insulina). Também na prática não existe um limite consensual que define a resistência insulínica.[23]

Uma nova avaliação, mais precisa, mas mais complexa é possível através do RIST, *Rapid Insulin Sensitivity Test*, um teste euglicémico hiperinsulinémico onde, após a determinação dos níveis basais estáveis de glucose, se administra insulina por via intravenosa, iniciando-se depois a perfusão de glucose, sendo esta perfusão reajustada de forma a manter a glicémia perto dos níveis basais. RIST mede a quantidade de glucose perfundida para manter a euglicémia.[24]

A resistência insulínica evidencia-se nas células hepáticas, musculares e adiposas. O músculo e o tecido adiposo são os que mais utilizam periféricamente a glucose, pelo que a diminuição dos transportadores de glucose (GLUT-4) e defeitos da actividade da *glicogénio-sintase* muscular contribuem para a hiperglicemia pósprandial.

No tecido adiposo, a resistência insulínica também se deve à diminuição da captação dos ácidos gordos livres e à diminuição da inibição da lipólise. Os ácidos gordos livres em circulação contribuem também para a inibição da secreção de insulina pelas células β . [22]

O receptor de insulina é composto por quatro subunidades: duas subunidades α , onde se liga a insulina e duas subunidades β . Quando a insulina se liga à subunidade α ,

estimula a auto-fosforilação de três resíduos de tirosina da subunidade β , estimulando activamente a actividade da ATP-ase dessa subunidade β . A actividade da ATP-ase activa diversos mensageiros intracelulares, que activam outras proteínas afectando o metabolismo intracelular das proteínas e também o crescimento celular.[25]

Na maior parte dos casos de resistência insulínica não se verificam alterações significativas na ligação da insulina à subunidade α , pelo que se pensa que os defeitos são devidos a processos subsequentes da acção da insulina.

Mais recentemente, foi proposto um novo mecanismo fisiológico apenas presente no estado pósprandial, onde o fígado é o órgão regulador e o músculo esquelético é o órgão efector. Este é um novo mecanismo de controlo da sensibilidade à insulina e baseia-se na hipótese de ocorrência de um reflexo parassimpático hepático, que promove a libertação de acetilcolina que actua nos receptores muscarínicos M1 do fígado, levando à produção de NO (óxido nítrico). Este NO, na presença de concentrações óptimas de glutatião hepático, promove a libertação da Substância Hepática Sensibilizadora de Insulina, HISS.[26] Esta secreção de HISS e consequente acção é máxima após a refeição e mínima em jejum, quando a sua acção não é desejada.

Assim, a resistência insulínica ocorre devido a diversos factores: hiperinsulinemia de qualquer causa, aumento dos ácidos gordos em circulação, alterações enzimáticas (por exemplo, na glicogénio-sintase).

Pode ocorrer em diversas fases do desenvolvimento e também em diversas patologias[27]:

- puberdade, gravidez e idade avançada,
- sedentarismo e plano alimentar inadequado,
- obesidade (principalmente obesidade abdominal visceral),
- diabetes *mellitus* tipo 2,
- endocrinopatias,
- hipertensão arterial,
- insuficiência hepática e renal,
- síndromes genéticas de resistência insulínica,
- autoanticorpos adquiridos contra o receptor de insulina,
- autoanticorpos adquiridos contra a insulina,
- alguns fármacos (corticoesteróides, por exemplo),

Além disto, sabe-se que as suas principais manifestações são[22]:

- hiperglicemia,
- aumento dos ácidos gordos em circulação,
- aumento da produção e secreção das VLDL e redução dos níveis de HDLc e ainda aumento das LDL pequenas e densas,
- hiperuricemia,
- hipertensão arterial por retenção renal de sódio.

A resistência insulínica é, em grande parte, reversível e pode depender de possíveis inibidores endógenos como a proteína cinase C (fosforila os resíduos de serina e treonina

que inibem a ATP-ase do receptor de insulina), ou diversas hormonas e factores com origem no tecido adiposo, ou ainda o factor de necrose tumoral α , a resistina e a leptina.

2.4 A Diabetes *Mellitus*

Segundo estatísticas da Organização Mundial de Saúde, em Agosto de 2011 existiam 346 milhões de diabéticos no mundo e em 2004 estimava-se que 3,4 milhões de mortes eram devidas a complicações associadas ao excesso de açúcar no sangue. Prevê-se actualmente que esse número duplique até 2030.[28]

Em 2005/2006, o 4º Inquérito Nacional de Saúde do Instituto Nacional de Estatística revelou que cerca de 5% da população portuguesa tomava medicamentos para a diabetes.[29]

Assim sendo, à problemática da diabetes para a saúde da população acrescem ainda os custos financeiros associados à sua medicação e tratamento hospitalar.

2.4.1 Contexto histórico

A diabetes *mellitus* é uma doença metabólica caracterizada por um aumento anormal da concentração de glucose no sangue. Diabetes provém da palavra grega para sifão, à qual foi adicionada a palavra *mellitus*, que significa mel, após ter sido reconhecido o sabor doce da urina diabética, sabor esse que foi descoberto no início do milénio, embora *mellitus* só tenha sido adicionada à nomenclatura da diabetes no início do século XVIII, por Rollo.[20]

A identificação do açúcar na urina diabética como glucose ocorreu em 1815, por Chevreul. Em 1840, Bernard demonstrou que a presença de glucose no sangue era normal e que esta era armazenada sob a forma de glicogénio, para posterior libertação na corrente sanguínea durante o jejum.[20]

Em 1880, Lancereaux subdividiu a diabetes segundo casos clínicos em *diabetes magra* e *diabetes gorda* consoante se aplicava a sujeitos magros ou obesos. Durante a década de 1930, Falta e Himsworth subdividiram novamente a diabetes em *insulino-sensitivo* ou *insulino-insensitivo*[20].

Estas duas nomenclaturas deram origem à actual nomenclatura da diabetes: *diabetes tipo 1* (insulino-dependente) e *diabetes tipo 2* (insulino-independente).

2.4.2 Patofisiologia da diabetes tipo 1

A diabetes tipo 1 é uma doença autoimune que é caracterizada pelo ataque de anticorpos às células β do pâncreas.[30]

É uma doença silenciosa na medida em que a destruição das células β pode prosseguir durante semanas, meses ou mesmo anos sem que os indivíduos se apercebam do que está a acontecer.

Quando a produção de insulina passa a ser insuficiente para manter um nível normal de glucose, verifica-se então deficiência insulínica e, mais tarde, um metabolismo anormal dos ácidos gordos, que conduz ao diagnóstico da diabetes tipo 1.[30]

A diabetes *mellitus* tipo 1 corresponde a 5%-10% do número total de casos de diabetes a nível mundial e é o tipo predominante em crianças e jovens até aos 20 anos de idade.[30]

A gestão da diabetes tipo 1 é feita através da monitorização do nível de glucose no sangue e através da administração de insulina. [30]

2.4.3 Patofisiologia da diabetes tipo 2

A diabetes mellitus tipo 2 é caracterizada pela presença de resistência insulínica ou por uma deficiência de insulina.[31] Pode manter-se assintomática durante vários anos e o seu diagnóstico é, a maioria das vezes, feito devido a complicações associadas à diabetes, ocorrendo normalmente após os 40 anos de idade, embora possa ocorrer mais cedo.

Esta patologia está muitas vezes associada à obesidade e hipertensão arterial, sabendo-se também que existe predisposição genética, embora não sejam conhecidos os genes associados a esta susceptibilidade.

A diabetes mellitus tipo 2 constitui cerca de 90% do total de casos de diabetes nos países desenvolvidos[28].

Sabe-se actualmente que indivíduos que manifestam hiperglicémia também manifestam outros parâmetros associados à diabetes, tais como: resistência insulínica, intolerância à glucose e uma deficiente função das células β . [31]

Estudos revelaram uma considerável deficiência no metabolismo da glucose para indivíduos ditos normais e intolerantes à glucose com histórico familiar de diabetes. Demonstraram também que indivíduos com familiares directos diabéticos apresentam resistência insulínica muito antes de lhes ser diagnosticada diabetes tipo 2.

Tais factos comprovam que a resistência insulínica é um dos factores com maior influência para o desenvolvimento da diabetes tipo 2.

Também a dieta nutricional e a falta de actividade física são dois factores contribuintes para o desenvolvimento da doença, por terem influência na acumulação de tecido adiposo.[32] O tecido adiposo branco também se apresenta anómalo, com baixa diferenciação dos adipócitos, supressão da lipólise e elevada expressão e secreção de citocinas inflamatórias.

O Sistema Nervoso Central também tem um papel importante, na medida em que este é o responsável pelo controlo do apetite, actividade física e peso corporal. O ritmo circadiano, que controla os ritmos do sono, também possui impotância dado que se podem relacionar desordens a nível do sono com a obesidade e a diabetes tipo 2.[32]

Para além disto, também os órgãos directamente relacionados com a insulina e a glucose sofrem alterações que conduzem à diabetes:

- as células β do pâncreas, responsáveis pela síntese e libertação da insulina,

quando danificadas, tornam-se num factor que contribui amplamente para o desenvolvimento da diabetes tipo 2, por perderem as suas capacidades funcionais.

- no fígado, uma elevada produção de glucose também contribui para a hiperglicémia nesta patologia.

Resumindo, duas importantes anomalias ocorrem na diabetes tipo 2:

- uma redução nos efeitos da insulina, isto é, ocorrência de resistência insulínica,
- uma redução da secreção de insulina pelas células β . [33]

2.5 O Síndrome Metabólico

O síndrome metabólico é uma patologia clínica associada à resistência insulínica, dislipidémia, obesidade central, hipertensão, intolerância à glucose, diabetes mellitus tipo 2 e microalbuminúria. [34]

O desenvolvimento dos diversos componentes do síndrome metabólico varia com a idade, peso e contribuição genética. [35]

Existem vários critérios para o diagnóstico do síndrome, porém, os utilizados neste estudo foram propostos pela Federação Internacional da Diabetes (IDF, *International Diabetes Federation*) e incluem o perímetro abdominal, a tensão arterial, nível de colesterol HDL, nível de glucose em jejum e valor de microalbuminúria. [36]

Tabela 2.1: Critérios para a definição do Síndrome Metabólico

Critérios		Valores
Perímetro Abdominal		
Homem		≥ 94 cm
Mulher		≥ 80 cm
Triglicéridos	≥ 150 mg/dl sangue	
HDL-Colesterol		
Homem		< 40 mg/dl sangue
Mulher		< 50 mg/dl sangue
Pressão Arterial	≥ 130 / ≥ 85 mm Hg	
Glucose em Jejum	≥ 100 mg/dl sangue	

A prevalência do síndrome metabólico está a aumentar mundialmente como consequência do aumento da obesidade. De facto, segundo a IDF, a obesidade é o factor de maior importância por estar também associada à resistência insulínica. A resistência insulínica e o síndrome metabólico estão associados ao aumento da concentração dos ácidos gordos livres no sangue.

Estes ácidos gordos promovem também o aumento da pressão sanguínea, supressão das HDL e aumento da concentração dos triglicéridos.

O aumento da obesidade visceral conduz ainda a estados inflamatórios e protrombóticos. [35]

O síndrome metabólico representa um elevado risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e ateroscleróticas. [34]

2.6 A disfunção endotelial

O endotélio corresponde à camada celular interna dos vasos sanguíneos e constitui a interface entre o sangue e a parede vascular.[37] É um órgão dinâmico e sensível a alterações mecânicas exercidas pelo fluxo sanguíneo e também a sinalização química.[38] Está envolvido na regulação de várias funções como: a regulação do tônus vascular, a adesão plaquetária, coagulação e aderência de leucócitos[37]. O endotélio segrega diversos mediadores tanto de vasoconstrição como de vasodilatação, de que é exemplo o óxido nítrico.[12]

O óxido nítrico desempenha diversas funções. É responsável pela manutenção do nível basal do tônus vascular e é um inibidor dos mecanismos que desencadeiam a aterosclerose.[12]

Disfunção endotelial é o termo que se associa a uma condição patológica em que o endotélio perde as suas propriedades fisiológicas de promoção da vasodilatação, da fibrinólise (destruição de coágulos de fibrina) e da antiagregação.[39]

O tecido adiposo segrega diversos compostos que afectam a função do endotélio, sendo os mais importantes a leptina, o factor de necrose tumoral α (TNF- α) e a interleucina-6 (IL-6).[12]

Estudos mais recentes demonstraram que as adipocinas (proteínas libertadas pelos adipócitos) afectam directamente a homeostasia vascular, podendo ser uma importante base para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares em indivíduos obesos.

O TNF- α , por exemplo, induz o stress oxidativo, que por sua vez leva à disfunção endotelial e à aterogénese.[12]

A IL-6 está associada à resistência insulínica, circula no sangue em concentrações elevadas e os seus níveis são também indicadores do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.[12]

Os ácidos gordos livres em excesso, ao aumentarem a pressão sanguínea, também induzem a disfunção endotelial, pois actuam afectando as vias do óxido nítrico e a relaxação vascular que é mediada pelo endotélio.[12]

Uma consideração a ter em conta relativamente à disfunção endotelial é o facto de esta ser progressiva. Em experiências efectuadas com ratos foi demonstrado que, à medida que a resistência insulínica aumentava, a disfunção endotelial progredia gradualmente.[38]

A disfunção endotelial representa a primeira fase do desenvolvimento de doenças vasculares e está associada a factores de risco como a diabetes *mellitus*, a hipertensão, a resistência insulínica, a idade avançada e a obesidade.

2.7 A análise da lágrima

A avaliação de patologias como a diabetes *mellitus*, a resistência insulínica e a disfunção endotelial é, actualmente, feita em laboratório com recurso a análises de determinados biomarcadores presentes no sangue.

Assim sendo, para além do tempo que está associado à análise de amostras sanguíneas, prende-se ainda outra problemática relacionada com o desconforto a que o paciente fica submetido durante a recolha de sangue e o custo financeiro associado a cada análise efectuada.

A acrescentar tem-se ainda a necessidade da existência de um ambiente laboratorial totalmente controlado, sujeito a avaliações periódicas para verificação do cumprimento dos parâmetros estabelecidos por lei.

As amostras de sangue apenas podem ser recolhidas por profissionais de saúde e devem ser identificadas, contendo o nome ou código do dador, a sua data de nascimento, género e a data de recolha da amostra.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a bancada e todas as superfícies de trabalho deverão ser desinfectadas no início de cada turno e sempre que visivelmente sujas.[40]

O material de colheita da amostra deverá ser descartável e é necessária a existência de um dispositivo de recolha do material utilizado.

O procedimento para a recolha de sangue implica fazer a higiene das mãos antes e depois da colheita, a utilização de luvas limpas bem ajustadas, a utilização de um dispositivo único para colheita, a desinfecção da pele do paciente e a identificação correcta da amostra. O material de colheita deverá, ainda, ser estéril.[40]

Para a colheita de sangue é ainda necessário decidir qual o material a usar dependendo da finalidade da recolha da amostra e também do ponto do corpo de onde se vai extrair a mesma.

Assim sendo, actualmente desenvolveu-se um método de análise de metabolitos mais rápido e totalmente indolor com recurso à lágrima.

A lágrima é um fluido extracelular que cobre as células epiteliais da superfície do olho, providenciando uma camada lisa perfeita que permite a refacção da luz para a retina.

As principais funções são: lubrificação, prevenção da desidratação, protecção contra agentes patogénicos e nutrição das células.[41]

A lágrima pode ser dividida em três camadas: uma camada externa lipídica, que contém lipídios essenciais para que esta não evapore, uma camada intermédia aquosa, que contém electrólitos (cálcio, potássio, sódio, magnésio), proteínas (enzimas, factores de crescimento, citocinas) e pequenas moléculas (glucose, ureia, lactato, aminoácidos) e uma camada interna que interage com a superfície endotelial.[3]

Os lípidos são secretados pelas Glândulas de Meibomian, a camada aquosa é produzida pelas Glândulas Lacrimais e a camada interna tem origem nas células de Goblet.

Trabalhos anteriores demonstraram a presença de metabolitos relacionados com a diabetes na lágrima, através da sua análise com recurso a diferentes técnicas.[3]

Neste trabalho usar-se-á, para análise da lágrima, o aparelho MCC-IMS[®] da empresa GAS, cujo princípio físico assenta na técnica de Espectrometria de Mobilidade Iónica (IMS).

2.8 Biomarcadores associados à Diabetes

Entende-se por biomarcador qualquer tecido, célula ou fluido biológico através do qual seja possível a medição de alterações celulares, moleculares ou bioquímicas. Actualmente, a definição foi alargada para incluir qualquer característica biológica que fosse passível de ser medida e avaliada como indicador de processos normais ou patológicos e ainda como indicador de uma resposta farmacológica resultante de uma terapêutica.[42]

Hoje em dia, os biomarcadores são utilizados para diagnósticos e monitorização de diversas patologias, tais como o cancro, doenças cardiovasculares, doenças imunológicas e genéticas e infecções.

Podem definir-se dois grupos de biomarcadores: os biomarcadores de exposição, que são utilizados para previsão do risco de ocorrência de determinada patologia e os biomarcadores de doença, utilizados para diagnóstico e monitorização de patologias. [42]

Neste trabalho, estudar-se-ão os biomarcadores de doença que estão associados à diabetes *mellitus*.

A diabetes é actualmente diagnosticada por via de análises sanguíneas conjuntamente com outros sintomas associados à Diabetes, já referenciados anteriormente.

Os biomarcadores associados à diabetes, que podem ser avaliados através de uma análise sanguínea são:

Tabela 2.2: Biomarcadores da Diabetes (análise sanguínea)

Biomarcador
Acetona [43]
Hemoglobina A1c [44]
Selectina - E [44]
ICAM -1 [44]
VCAM -1 [44]
Adiponectina [45]
Apolipoproteína B [45]
Ferritina [45]
Proteína C reactiva [45]
Insulin [45]
Glucose

A análise dos VOCs presentes na lágrima poderá ser utilizada para diagnóstico da diabetes e controlo da glicémia de pacientes, uma vez que na lágrima se encontram compostos como, por exemplo, glucose e a apolipoproteína A.[3]



Técnicas de Caracterização de VOCs

3.1 A Espectrometria de Mobilidade Iónica

3.1.1 Descrição do princípio físico

A atmosfera do IMS é constituída por um gás inerte (azoto 5.0), que é ionizado por uma fonte de ionização (trítio), originando iões e electrões secundários livres.

O gás ionizado reage com as moléculas de água presentes na atmosfera do IMS e origina iões reactivos. Os iões reactivos podem ser positivos, $H^+(H_2O)_n$, ou negativos, $O^{2-}(H_2O)_n$. A quantidade de iões reactivos disponíveis origina o pico de iões reactivos, RIP, do inglês *reactant ion peak*. [46]

Os iões reactivos reagem com as moléculas da amostra e formam iões-produto, que são então inseridos num campo eléctrico estável, deslocando-se ao longo do tubo de deriva onde existe um gás neutro que colide com os iões, fazendo com que estes diminuam a sua velocidade e se separem melhor.

A separação dos iões é feita com base na sua massa e na sua mobilidade, isto é, os iões mais pequenos movem-se mais depressa no tubo porque a sua área de colisão com as moléculas do gás de deriva é menor. Assim, pode afirmar-se que a mobilidade iónica é inversamente proporcional ao tempo que os iões demoram a atravessar o tubo de deriva.

A velocidade é dada por:

$$v = KE \quad (3.1)$$

onde E é o valor do campo eléctrico em Volts e K pode ser obtido através da expressão:

$$K_0 = K \left(\frac{P_d}{P_0} \right) \left(\frac{T_0}{T_d} \right) \quad (3.2)$$

onde K_0 é a constante de mobilidade iônica, T_0 é a temperatura de 273K e P_0 é a pressão de 101,325kPa. T_d e P_d são a temperatura e pressão medidas no tubo de deriva, respectivamente.[46]

No final da separação os iões são recolhidos por um detector, ao qual se dá o nome de Faraday-Plate. Este detector recolhe os iões e fornece um sinal dependente do tempo correspondente à mobilidade dos iões que chegam.[47]

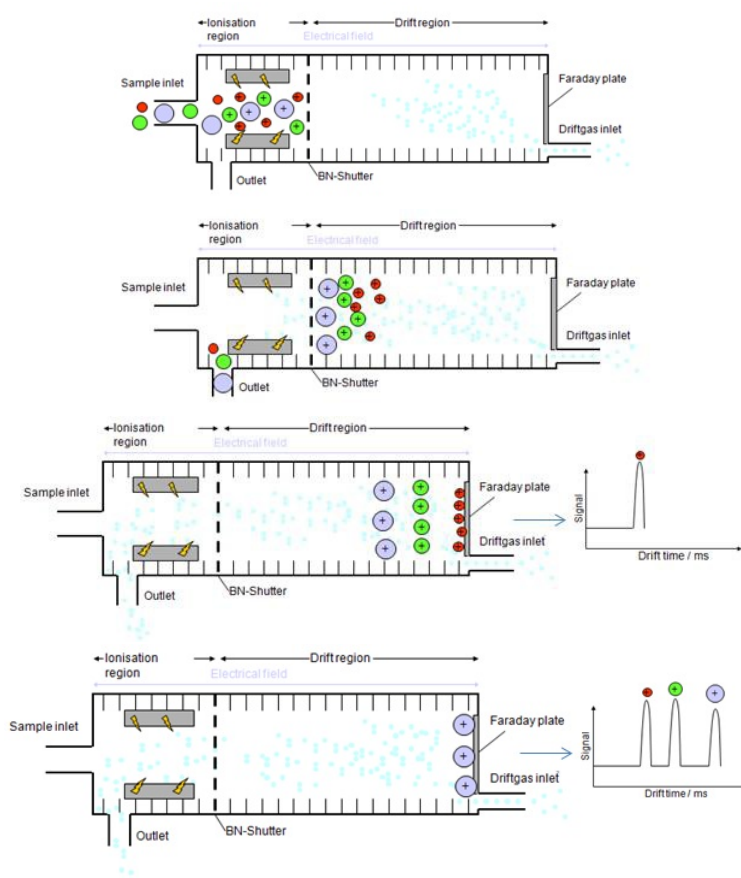


Figura 3.1: Princípio físico do IMS. 1- As moléculas de gás neutro são ionizadas na câmara de ionização, local onde também são introduzidas as moléculas da amostra, formando-se iões-produto. 2- Os iões atravessam a grelha de separação, entrando no tubo de deriva e viajando em oposição ao gás de deriva. 3 e 4- Os iões são separados de acordo com a sua massa e estrutura, chegando ao detector, obtendo-se assim o espectro de mobilidade. [48]

O espectro resultante da mobilidade dos iões dá informação acerca dos compostos presentes na amostra de gás inicial.[49] No eixo dos yy tem-se a informação da intensidade do sinal em Volts e no eixo dos xx tem-se a informação do tempo de deriva.

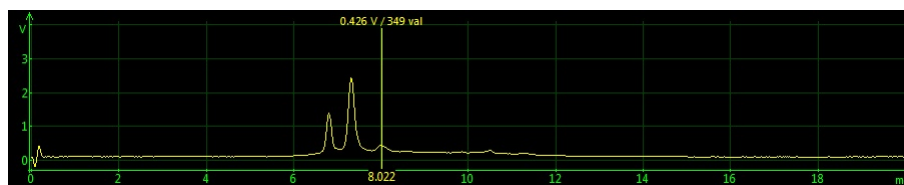


Figura 3.2: Exemplo de um espectro de intensidade e tempo de retenção obtido através de MCC-IMS. Imagem obtida no laboratório.

Quando é necessária uma análise de misturas mais complexas, que exigem maior sensibilidade, utiliza-se um método de pre-separação com recurso a uma coluna multicapilar. Neste caso, o espectro obtido é diferente do descrito anteriormente pois dá também informação acerca do tempo que os iões demoram a ser pré-separados, tempo este que se denomina por tempo de retenção.[50]

O tempo de retenção depende da taxa de fluxo do gás, da temperatura da coluna, das propriedades das moléculas, da pressão, da polaridade e da estrutura molecular dos componentes.

O espectro obtido possui, então, no eixo dos xx informação relativa ao tempo de deriva, no eixo dos yy informação relativa ao tempo de retenção e a intensidade dos picos, que é dada pela variação das cores.[49]

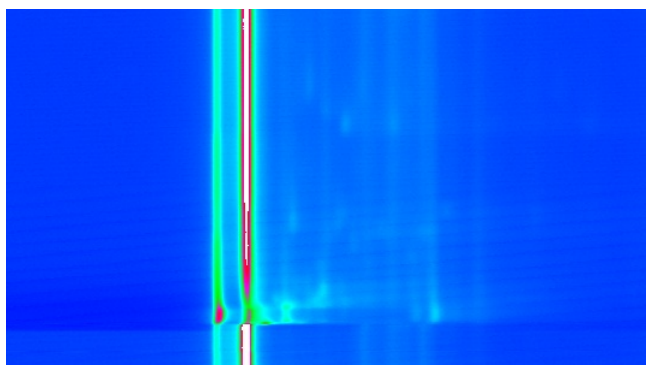


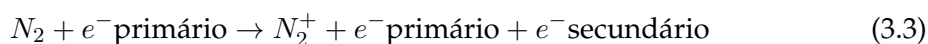
Figura 3.3: Exemplo de um espectro obtido através de MCC-IMS. Imagem obtida no laboratório.

3.1.2 A fonte de ionização e a formação de iões reactivos positivos e negativos

Embora se possam utilizar como fontes de ionização lâmpadas de ultra-violeta, lasers ou descargas eléctricas, a fonte de ionização mais comum do IMS é uma fonte radioactiva, emissora de partículas α ou β .

Esta fonte tem a vantagem de não necessitar de um fornecimento de potência externo, nem de manutenção e efectua uma ionização estável.

A ionização faz-se através da libertação de electrões primários de alta energia que colidem com as moléculas de azoto (gás inerte que constitui a atmosfera do IMS) originando um ião positivo e um electrão secundário:



O electrão primário perde alguma energia no processo de ionização, contudo continua a ser um electrão de elevada energia pelo que pode colidir com as moléculas de azoto, dando origem a novas ionizações. Também o electrão secundário colide com moléculas de azoto, originando ionizações.

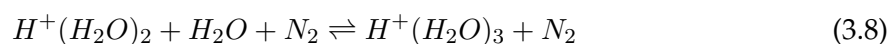
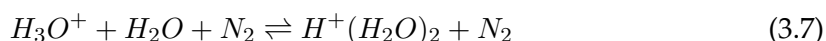
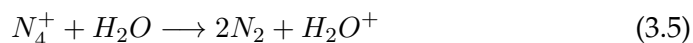
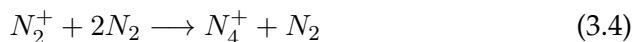
No azoto, cada colisão liberta 35eV e sabe-se que os processos de ionização terminam quando a energia dos electrões for menor que a energia de ionização do azoto (14,534 V).[46]

Se o gás que constitui a atmosfera do IMS não for puro formar-se-ão iões de outros tipos que não são desejados, dando origem a espectros incorrectos.

Quando o electrão já não participa em processos de ionização passa a encontrar-se em equilíbrio térmico, dizendo-se termalizado.[4]

Os electrões termalizados em conjunto com os iões de azoto originarão os iões reactivos positivos e negativos.

Os iões reactivos positivos formam-se a partir das seguintes reacções[4]:



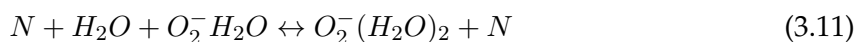
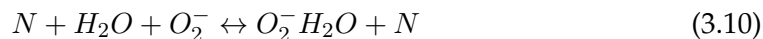
A formação dos iões hidratados (iões reactivos) observada nas duas últimas equações pode continuar com o aumento do número de moléculas de água no ião, sendo que é dependente da concentração de humidade presente.

O RIP formado por estes iões reactivos é observado no espectro como um pico intenso e está presente em todos os espectros.

Os iões reactivos negativos têm um processo de formação diferente dos positivos.

Quando o azoto é puro forma-se um grande número de electrões livres de baixa energia que podem ser capturados por espécies neutras como o oxigénio.

A partir desta captura, se se estiver na presença de moléculas de água, originam-se iões reactivos negativos[4]:



onde N pode ser qualquer molécula neutra.

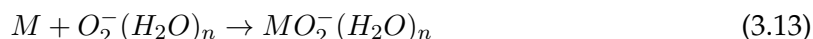
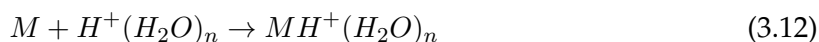
A fonte radioactiva está continuamente a produzir iões reactivos, pelo que a quantidade de iões reactivos positivos e negativos formados é semelhante[4].

Após a sua formação, os iões reactivos são extraídos pelo campo eléctrico e separados de acordo com a sua carga por forma a evitar que existam colisões e reacções de neutralização de iões devidas às forças de Coulomb de atracção.

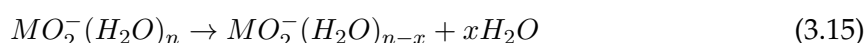
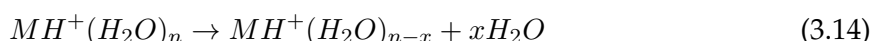
3.1.3 Formação dos iões-produto e as polarizações positiva e negativa

Os iões reactivos são responsáveis pela ionização das amostras dado que transferem a sua carga para as moléculas dos analitos da amostra, por colisões com as mesmas. Através destas colisões formam-se então iões-produto.[4]

Os iões produto libertam, então, moléculas de água, por forma a atingirem estabilidade[4]. Este processo acontece com ambos os tipos de iões reactivos, da seguinte forma:



(formação dos iões-produto)



(estabilização dos iões-produto)

onde M são as moléculas da amostra que serão ionizadas e onde o valor de x depende da concentração de humidade mas assume, normalmente, valores entre 1 e 3[4].

Estes processos de ionização dizem-se suaves pois não existe fragmentação do ião-produto.

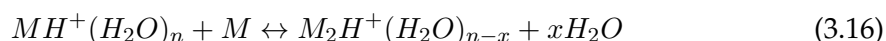
A taxa de produção dos iões-produto depende da concentração dos iões reactivos, da concentração das moléculas neutras e da frequência de colisão dos iões com as moléculas neutras[4].

Ainda, a quantidade de carga disponível pelos iões-reactivos para formar iões-produto depende da fonte de ionização pois é a energia dos electrões libertados que determina o número máximo de moléculas de azoto que podem ser ionizadas[4].

O número de iões reactivos vai depois diminuindo à medida que se formam iões-produtos. Tal pode ser constatado pela diminuição do RIP à medida que surgem novos picos no espectro.

Se se der a união de uma molécula de amostra com um ião-produto já formado obtém-se um dímero[4]. Tal ocorrência dá-se quando a concentração da amostra é relativamente elevada.

A formação de dímeros, na polarização positiva ocorre da seguinte forma[4]:



A formação de dímeros conduz à diminuição do pico de iões reactivos e do pico de iões-produto inicial[4]. Mais, se a concentração de analitos for muito elevada pode também ocorrer a formação de trímeros. A concentrações muito elevadas pode ainda ocorrer que não existam iões reactivos suficientes para ionizar todas as moléculas de um composto, ocorrendo saturação. A saturação é uma situação que deve ser evitada[4].

Os picos formam-se no modo positivo ou negativo conforme a substância a analisar tenha maior afinidade para os iões-produto positivos ou negativos, respectivamente.

3.1.4 A mobilidade dos iões

A mobilidade dos iões-produto está relacionada com o comprimento do tubo de deriva, com a intensidade do campo eléctrico e com o tempo de abertura da válvula, pelo que, alterações nestes parâmetros podem levar a alterações dos valores dos tempos de deriva para a mesma espécie iónica presente na mesma concentração. A temperatura e a humidade são também parâmetros que podem conduzir a alterações, porém, por serem parâmetros intrínsecos, são mais difíceis de controlar[51].

A variação na concentração de humidade pode alterar a posição dos picos bem como a sua forma. Água presente na região de deriva provoca o alargamento dos picos porque influencia a abundância das espécies iónicas[51].

O aumento da temperatura reduz o número de moléculas de água disponíveis num ião reactivo pelo que aumenta os valores de mobilidade reduzida.

3.1.5 Os limites de detecção

O limite de detecção de uma dada técnica diz respeito à menor quantidade ou concentração de um analito que pode ser detectada por essa mesma técnica.

No caso da Espectrometria de Mobilidade Iónica, os limites de detecção situam-se na ordem de grandeza dos ppb_v e dos ppt_v (respectivamente, parte por bilião de volume e parte por trilião de volume), isto é, valores de nanograma a picograma por litro.[4]

O MCC-IMS é capaz de detectar tão baixas concentrações porque possui elevada eficiência de ionização química à temperatura ambiente e elevada eficiência na obtenção de iões-produto através das colisões ião-reactivo/molécula.[4]

3.1.6 O MCC-IMS

O MCC-IMS possui uma eficiência elevada na detecção de metabolitos porque alia uma pré-separação eficiente efectuada pela coluna multicapilar com uma elevada sensibilidade da técnica de análise.

O resultado final da análise é visualizado pelo utilizador sob a forma de um espectro de mobilidade iónica, que dá informação acerca do tempo de retenção dos compostos ao percorrerem a coluna multicapilar e acerca do tempo de deriva dos compostos no interior do tempo de deriva.

A realização de uma análise completa e a obtenção do espectro correspondente demoram, normalmente, apenas entre 1 a 6 minutos, pelo que a análise pode ser considerada como rápida[52].

De entre as várias técnicas não-invasivas que poderiam ser utilizadas, a Espectrometria de Mobilidade Iónica acoplada a uma coluna multicapilar possui a grande vantagem de não necessitar de qualquer tipo de pré-concentração[52] da amostra a analisar.

Assim sendo, para além da simplicidade, eficácia e rapidez da técnica, pode ainda afirmar-se que a quantidade de material utilizado para a realização deste estudo é menor quando comparada com outras técnicas.

Contudo, existem ainda diversas dificuldades associadas a esta técnica. Em primeiro lugar, existe falta de informação sobre os compostos com baixa afinidade protónica pois os compostos com elevada afinidade protónica são formados preferencialmente. Em segundo lugar, ainda não existe a possibilidade de identificar as substâncias que estão a ser analisadas. Por último, a posição dos picos pode sofrer variações mesmo para um mesmo composto a ser analisado com o mesmo aparelho. Estas variações devem-se à alteração do programa de análise, à variação dos fluxos de gás e até à concentração do analito.

A visualização de um espectro só não fornece informação suficiente para caracterizar uma amostra. Porém, numa série de amostras, mesmo que desconhecidas, analisadas no mesmo aparelho e com as mesmas características de análise, é possível chegar a conclusões muito interessantes por comparação de espectros. Por exemplo, é possível determinar se uma dada amostra contém um metabolito se se souber que outra amostra o tem, comparando ambos os espectros.

Os valores de mobilidade reduzida permitem eliminar as variáveis que produzem alterações nos picos observados. São valores determinados a partir do tempo de deriva. A cada analito corresponde um determinado valor de mobilidade reduzida e um determinado tempo de retenção (que não é contemplado para o cálculo da mobilidade reduzida), que assim permitem uma detecção inequívoca dos analitos.

3.1.6.1 Instrumentação

O MCC-IMS, ilustrado no esquema seguinte, possui:

- um sistema de introdução da amostra,
- um *loop*,
- uma coluna multicapilar,
- O IMS (que é composto por uma câmara de ionização, grelha de separação de iões, tubo de deriva e colectores de iões),
- uma bomba de sucção,
- uma válvula de 6 vias,
- dois fluxómetros,
- sensores de temperatura.

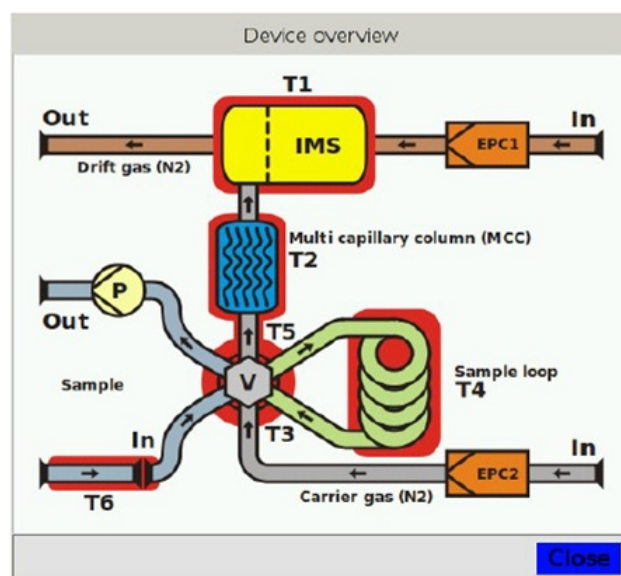


Figura 3.4: Esquema interno do aparelho MCC-IMS [52]

A válvula de 6 vias coordena a entrada da amostra e do gás de arraste no loop e na coluna multicapilar.

Na realização de uma análise, quando a válvula se encontra na posição-padrão (Posição A), a bomba P é ligada, arrastando a amostra para o interior do loop, sendo que esta fase é designada por "Enchimento do Loop". A bomba é, então, desligada e a válvula muda de posição para a Posição B. O gás de arraste entra no loop forçando a amostra a percorrer todo o loop e a dar entrada na coluna multicapilar, onde ocorre a eluição das substâncias.[52]

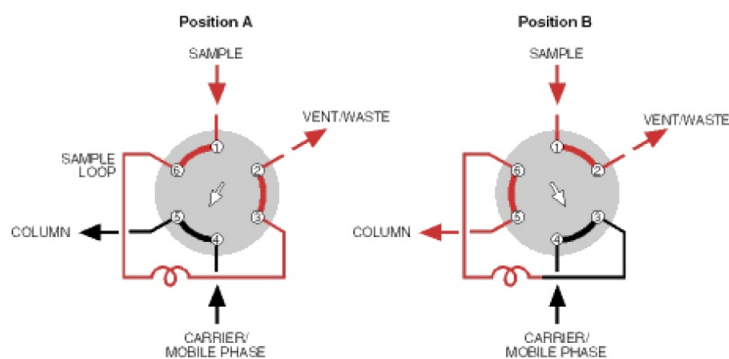


Figura 3.5: Posições da válvula do MCC-IMS [52]

Após a passagem pela coluna multicapilar, os compostos pré-separados entram na região de ionização onde ocorre a separação dos mesmos segundo o princípio já descrito anteriormente.

A tabela seguinte descreve as características do MCC-IMS.

Tabela 3.1: Características do MCC-IMS

Princípio de funcionamento	Espectrometria de mobilidade iónica
Método de ionização	Radiação - β
Fonte de ionização	Trítio (^3H)
Actividade	300 MBq
Polaridade da voltagem	Positiva ou Negativa (variável)
Limites de detecção	Escala ppb _v
Volume do loop	5 ml

3.1.6.2 Interface

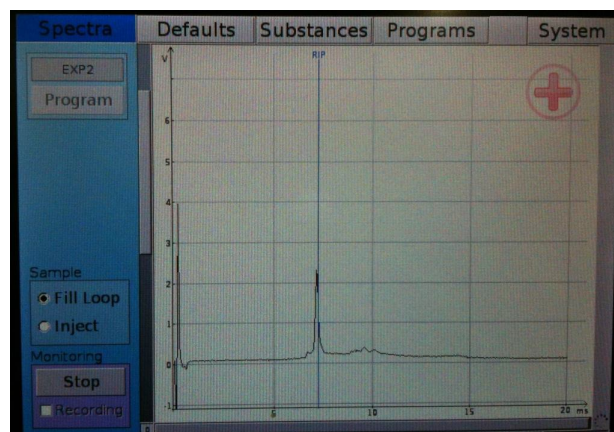
Do ponto de vista do utilizador, o MCC-IMS é bastante fácil de operar. O seu painel frontal é constituído por um ecrã que permite visualizar o sistema e um botão rotativo que permite navegar pelo sistema funcionando ainda como botão de selecção (*enter*) quando se pressiona o botão.

No painel central encontra-se ainda um botão de *ESC*, uma porta *USB* e o local de introdução da amostra.

No ecrã é possível visualizar as 5 opções do menu (cada uma correspondendo a uma janela diferente): *Spectra*, *Defaults*, *Substances*, *Programs* e *System*.

- ***Spectra***

É a janela que permite visualizar o espectro de mobilidade em tempo real, que permite iniciar a análise e mostrar o espectro no modo positivo ou negativo.

Figura 3.6: Janela *Spectra*

• *Defaults*

É a janela que permite definir os diversos parâmetros do funcionamento: fluxos, temperaturas, intensidade da bomba, polaridade e *averaging*.

Tabela 3.2: Função de cada parâmetro do MCC-IMS

Parâmetro	Função
EPC1	define o fluxo do gás de deriva
EPC2	define o fluxo do gás de arraste
T1	temperatura do IMS
T2	temperatura da MCC
T3	temperatura da válvula
T4	temperatura do loop
T5	temperatura do tubo aquecido entre a MCC e o <i>loop</i>
T6	temperatura do tubo de inserção da amostra
<i>Pump</i>	regula o fluxo da amostra de gás a introduzir
<i>Averaging</i>	número médio de espectros adquiridos
<i>Trigger</i>	regula a duração do <i>trigger</i>

• *Substances*

É a janela que permite programar a detecção de compostos já conhecidos.

• *Programs*

Permite ao utilizador seleccionar um modo de operação já existente, alterá-lo ou criar novos modos de operação.

• *System*

Mostra informação específica do sistema e permite ainda alterar o local de armazenamento dos ficheiros.

3.1.6.3 Portabilidade do MCC-IMS

O MCC-IMS não necessita de qualquer tipo de pré-concentração da amostra nem de vácuo. Além disto, as suas dimensões fazem do MCC-IMS um instrumento passível de transportar com relativa facilidade.

Assim pode afirmar-se que o MCC-IMS é um instrumento portátil o que permite uma utilização mais versátil do mesmo. A montagem experimental utilizada neste trabalho continua a ser portátil uma vez que o bloco de aquecimento e restantes equipamentos têm dimensões pequenas, o que também os torna fáceis de transportar.

Tabela 3.3: Dimensões do MCC-IMS

Dimensões	Peso
449 x 375 x 177 mm	15,5 kg

3.2 Outras técnicas de análise

Existem outras técnicas com sensibilidade que pode ser equiparada à do MCC-IMS, como por exemplo GC-MS, SIFT-MS e PTR-MS. Abaixo referem-se as principais diferenças entre estas técnicas e o MCC-IMS.

3.2.1 GC-MS

GC-MS (espectrometria de massa de cromatografia gasosa) é uma técnica que permite a separação e identificação de compostos orgânicos voláteis e alguns compostos gasosos inorgânicos a partir de uma mistura química.

Possui dois componentes: o GC, que efectua a separação dos compostos através de cromatografia gasosa e o MS (espectrómetro de massa) que permite a identificação dos diferentes compostos.

Nesta técnica, após serem separadas na coluna de cromatografia, as substâncias são introduzidas no espectrómetro onde sofrem ionização, o que também fragmenta as moléculas em iões, separando-os num campo eléctrico e gerando assim um sinal eléctrico.[53]

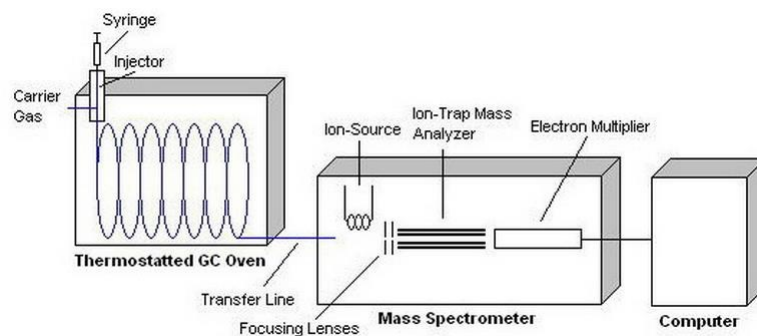


Figura 3.7: Esquema do sistema GC-MS [54]

O utilizador visualiza as informações através de uma representação gráfica, o espectro de massa que possui, no eixo dos xx , informação relativa à relação massa/carga dos iões e, no eixo dos yy informação relativa à abundância de cada ião.

As maiores diferenças relativamente ao MCC-IMS prendem-se com os seguintes pontos:

- o tempo de análise da técnica de GC-MS é muito demorado[55],
- as amostras sólidas para análise em GC-MS necessitam de ser dissolvidas previamente porque o GC-MS não possui a capacidade de analisar sólidos[53],
- a técnica de GC-MS necessita de pré-concentração dos analitos[55].

Além disto, a técnica de GC-MS necessita de vácuo, enquanto que o MCC-IMS não necessita de vácuo para a realização das análises.

O processo de ionização na técnica de GC-IMS ioniza directamente as moléculas o que se pode traduzir em dificuldades na análise do espectro, enquanto que no MCC-IMS as moléculas de gás é que são ionizadas, pelo que não ocorre fragmentação das mesmas.[53]

As temperaturas de funcionamento do GC-MS são muito mais elevadas que as temperaturas de funcionamento do MCC-IMS, o GC-MS não é transportável devido à necessidade de vácuo e ainda, o GC-MS possui bibliotecas, o que permite a identificação dos compostos.

Para terminar, tão importante como qualquer outra diferença é o custo do aparelho de cada técnica, sendo que o aparelho de GC-MS tem um custo muito superior.

3.2.2 SIFT-MS

SIFT-MS (espectrometria de massa associada a um tubo de deriva de selecção de iões) é uma técnica que utiliza iões precursores para ionizar gases numa amostra gasosa[56]. É a técnica que está na origem da PTR-MS (sendo que o PTR-MS possui maior sensibilidade).[55]

Os iões são produzidos por uma descarga eléctrica e passam através de um quadrupolo onde são separados tendo em conta a sua relação massa/carga. Esta separação funciona como um filtro que permite que apenas os iões com determinada relação m/z passem para a próxima parte do instrumento, o tubo de deriva.

Ao entrarem no tubo de deriva, os iões são misturados num gás inerte, sendo que os iões precursores positivos reagem com as moléculas da amostra originando iões-produto que são depois transportados ao longo de um segundo quadrupolo (inserido no espectrómetro de massa). O espectrómetro de massa detecta então os iões-produto.[55]

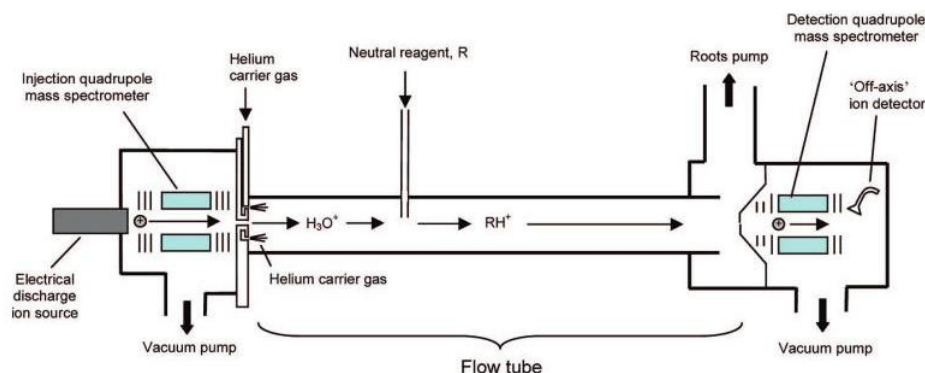


Figura 3.8: Esquema do sistema SIFT-MS [55]

Nesta técnica, a fragmentação dos íões-produto é muito reduzida pelo que se pode analisar a mistura de compostos no ar sem a necessidade de utilização de técnicas de separação complicadas, o que permite uma análise em tempo real.[57]

As vantagens do MCC-IMS relativamente ao SIFT-MS prendem-se com a elevada sensibilidade do MCC-IMS e com a sua possibilidade de ser miniaturizado.

3.2.3 PTR-MS

PTR-MS (espectrometria de massa por reacção de transferência de protões) é uma técnica que permite a detecção de compostos orgânicos voláteis maioritariamente provenientes de fontes naturais. [55]

Esta técnica utiliza a ionização química gasosa, feita através de transferência protónica [57] em que a fonte de protões é, normalmente, H_3O^+ . Os íões, depois de criados, são injectados no tubo de deriva que é percorrido por um fluxo elevado de um gás inerte e sujeitos a um campo eléctrico, ganhando velocidade até atingirem o espectrómetro de massa onde são analisados.

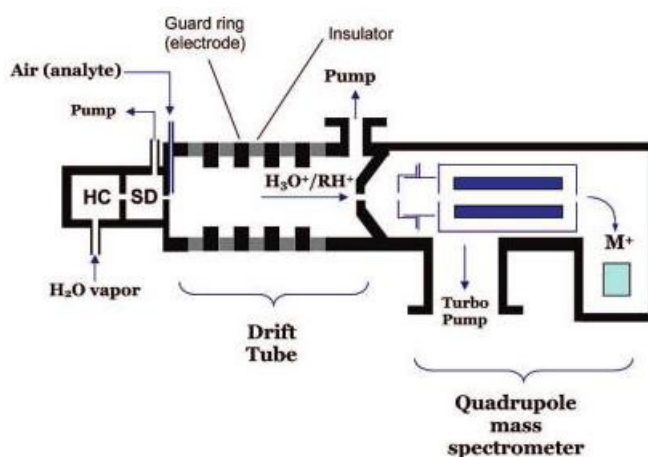


Figura 3.9: Esquema do sistema PTR-MS [55]

É, por vezes, considerada uma técnica de ionização suave porque o excesso de energia libertada na transferência protónica é suficiente para evitar que exista uma elevada fragmentação dos iões.[55]

O PTR-MS difere do MCC-IMS porque utiliza vácuo e, conseqüentemente, não pode ser miniaturizado. Além disto, o PTR-MS possui fragmentação, mesmo que suave e o MCC-IMS possui fragmentação nula.

4

Materiais e Metodologia

4.1 Material Utilizado

Como já referido anteriormente, a Espectrometria de Mobilidade Iônica associada a uma coluna multicapilar, para além da sua rapidez e eficácia, tem ainda a vantagem de não utilizar muito material pois não necessita de vácuo nem de nenhuma técnica de pré-concentração da amostra.

As amostras de lágrima foram recolhidas em tiras estéreis de teste do fluxo de lágrima Sno*Strips que foram imediatamente colocadas em viais de 20 ml, fechados com tampas magnéticas roscadas de centro aberto e septos de borracha (*butyl red /PTFE grey*) de 1,6 mm de espessura, todos provenientes da VWR (Radnor, PA). Os frascos contendo as amostras foram aquecidos utilizando um bloco de aquecimento também da VWR. A temperatura deste bloco de aquecimento foi controlada através da utilização de um termómetro digital da FLUKE (Everett, Washington).

A amostra foi introduzida no analisador através de uma agulha com 0,8 mm de diâmetro interno por 40 mm de comprimento ligada a um tubo de Teflon de 1 mm de diâmetro interno, fornecido pela Bohlender GmbH (Grünsfeld, Alemanha) onde na terminação oposta à agulha foi colocada um *nut* fêmea da Swagelok (Solon, Ohio) para fazer a ligação ao aparelho.

A tabela seguinte sintetiza o material utilizado.

Tabela 4.1: Material Utilizado na Realização dos Testes

Material
Espectrómetro de Mobilidade Iónica (MCC-IMS) GAS [®]
Garrafa de Azoto 5.0
Bloco de Aquecimento Analógico VWR [®]
Termómetro Digital FLUKE 2175A [®]
Tiras estéreis de teste do fluxo de lágrima Sno*Strips [®]
Vais de 20 ml
Tampas roscadas com orifício e septo de silicone
Agulha

4.2 Metodologia

4.2.1 Recolha da amostra

A recolha do fluido lacrimal é feita tendo por base o Teste de Schirmer 1, que não utiliza nenhum tipo de anestésico. Nesta recolha, uma tira estéril é colocada no interior da região temporal da pálpebra inferior (de ambos os olhos) de cada paciente. O paciente fecha então os olhos durante 3 minutos, após os quais a tira é recolhida e acondicionada num vial de vidro de 20 ml para posterior análise.

A razão pela qual a tira é colocada na região temporal da pálpebra prende-se com os seguintes factos:

- As glândulas lacrimais, responsáveis pela produção da fase aquosa (e compostos relevantes para este estudo) da lágrima, situam-se na porção temporal superior de cada olho;
- Os canais lacrimais encontram-se na porção nasal de cada olho e comunicam com o saco lacrimal que por sua vez comunica com a cavidade nasal, pelo que poderia ocorrer a contaminação da amostra em estudo, por compostos provenientes do nariz.

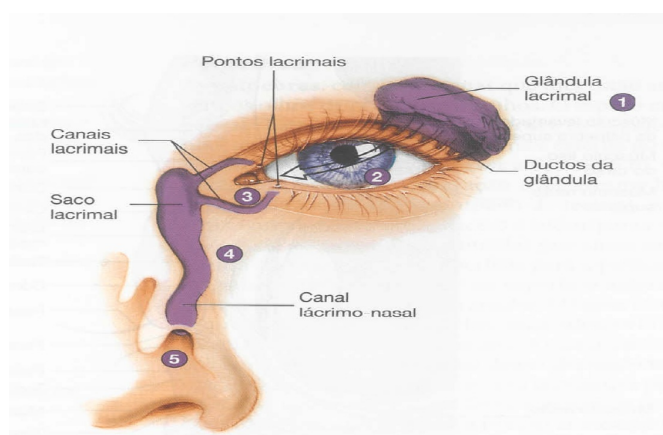


Figura 4.1: Localização das glândulas e canais lacrimais [58]

- A córnea é uma região de extrema sensibilidade pelo que qualquer contacto da tira com a mesma poderia provocar lesões corneanas.

Importa ainda referir que os pacientes foram previamente informados acerca do procedimento, confidencialidade e objectivos deste estudo, tendo consentido a recolha da amostra da sua lágrima.

As amostras recolhidas foram classificadas consoante os níveis de glicémia médios de cada paciente (avaliados através de análises sanguíneas prévias). Assim sendo, os pacientes foram divididos em 2 grupos: controlo e diabético.

Inicialmente, retirou-se amostra da lágrima dos olhos direito e esquerdo a ambos os grupos deste estudo. Porém, o grupo de controlo não apresentava picos com relevância e, como os espectros de ambos os olhos eram semelhantes, passou a recolher-se apenas a lágrima do olho direito ao grupo de controlo. No grupo de diabéticos continuou a efetuar-se a recolha da lágrima dos dois olhos, para efeitos comparativos dos espectros, pois não se sabia se seriam observadas diferenças entre os espectros dos dois olhos.

4.2.2 Caracterização dos grupos em estudo

O grupo de controlo apresenta um índice de glicémia dentro dos parâmetros considerados normais pela IDF e o grupo diabéticos apresenta um índice de glicémia superior a 100 mg/ml.

O grupo de controlo é composto por 9 indivíduos de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 23 e os 67 anos. Destes, 3 são do sexo feminino e 6 são do sexo masculino.

O grupo de diabéticos é composto por 9 indivíduos de ambos os sexos com idades compreendidas entre os 25 e os 72 anos. Destes, 6 são do sexo feminino e 3 são do sexo masculino. Do grupo de indivíduos diabéticos, apenas um não fazia qualquer tipo de administração de insulina.

4.2.3 Análise da amostra

O protocolo de análise das amostras é simples, de fácil execução e demora apenas alguns minutos.

Tendo em conta as características da amostra em estudo, adoptou-se a seguinte metodologia:

- Um vial com a amostra recolhida foi colocado a aquecer na placa de aquecimento analógica. O tempo de aquecimento foi 10 minutos e a temperatura de aquecimento foi 60°C.

O vial estava ligado ao MCC-IMS por intermédio da agulha, que se encontrava inserida no vial através do septo de silicone na tampa do mesmo.

- Durante os 10 minutos de aquecimento, dá-se o equilíbrio do *headspace* pelo que, neste caso, o tempo de equilíbrio é também 10 minutos.

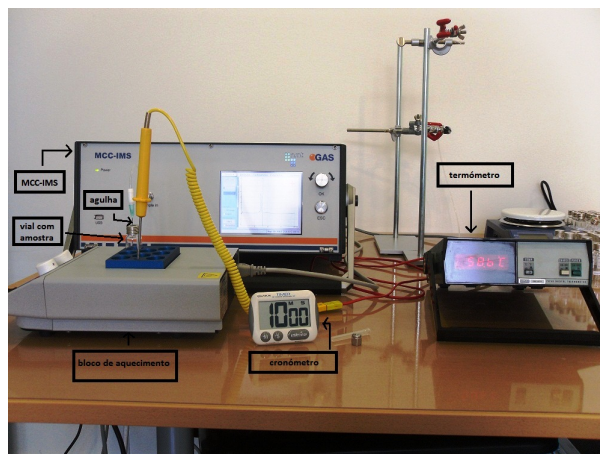


Figura 4.2: Esquema da montagem experimental. Imagem obtida em laboratório.

O tempo de aquecimento serviu também como tempo de equilíbrio de *headspace*. O *headspace*, é o volume existente na parte superior de um frasco parcialmente cheio, e fechado. A amostra, quando aquecida, liberta compostos voláteis e estes vão acumular-se no espaço livre de amostra do frasco, na agulha e no tubo, entrando em equilíbrio com o volume de ar já aí existente, chamando-se a este processo equilíbrio de *headspace*.

- De seguida, analisam-se os compostos voláteis da amostra. O programa para análise do *headspace* da amostra de lágrima tem o nome de EXP2_10MIN e possui as seguintes características de operação:

Tabela 4.2: Características de funcionamento do programa EXP2_10MIN

Spectra	Time	V	P	R	E1	E2	T1	T2	S
0	0 ms		12%						
1	231 ms			rec					
14	3,234 s	open	off						
36	8,316 s	close							
2598	10m00s			stop					
2599	10m00s	-	-	-	-	-	-	-	-

Os parâmetros de análise das amostras foram os seguintes:

Tabela 4.3: Parâmetros de Análise

Fluxo EPC1	500 ml/min
Fluxo EPC2	25 ml/min
Averaging	10
Temperatura de Aquecimento da Amostra	60°C
Tempo de Equilíbrio do Headspace	10 min

As características do modo de operação foram escolhidas de forma a otimizar os resultados obtidos. Foi necessário calcular o tempo de funcionamento da bomba e a sua intensidade de bombeamento durante a Posição A, o tempo de abertura da válvula na

Posição B e o tempo de corrida do modo de operação.

As alterações a efectuar no modo de operação são realizadas seleccionando o *spectra*, ou espectro individual. O *spectra* determina o valor de tempo correspondente ao início de uma determinada acção. O *spectra* relaciona-se com o valor de tempo através de um parâmetro denominado por *averaging*. Para um *averaging* de 10, escolhido para a realização deste trabalho, a diferença entre dois *spectra* é de 231ms. O valor de *averaging* tem apenas a ver com o detalhe que se pretende obter no espectro final.

- Tempo de funcionamento da bomba

A bomba começa a funcionar no início do modo de operação, ficando a funcionar durante toda a Posição A, enchendo o *loop* com a amostra.

O frasco tem um volume de 20ml e o *loop* tem um volume de 5ml. Assim sendo, o volume a retirar do frasco será sempre inferior ou igual a 20ml. Idealmente, 5ml seriam suficientes para encher o *loop*, não existindo perdas e garantindo que na coluna é apenas inserida amostra.

Porém, existe ainda outro aspecto a considerar. A agulha e o tubo também possuem volume, que não é desprezável. O volume do tubo de teflon é 0,371ml, o volume da agulha é 0,0201ml e o volume do cone que une a agulha ao tubo é 0,0293ml. Assim sendo, o volume a retirar do frasco é 5,4204ml.

Com a bomba a 12%, o fluxo de sucção é de 96ml/min pelo que o volume da amostra é retirado em 3,6136 segundos.

A bomba inicia o seu funcionamento aos 0 segundos, o que corresponde ao espectro 0. Para a percentagem de 12%, a bomba tem que parar aos 3,6136 segundos, o que corresponde ao espectro 14.

- Tempo de abertura da válvula

O tempo de abertura da válvula depende dos fluxos utilizados e do volume de amostra que se pretende introduzir na coluna multicapilar e no IMS.

Após o *loop* estar cheio com amostra, a válvula troca para a Posição B, permitindo que a amostra saia do *loop* e atravesse a coluna multicapilar e o IMS.

Segundo o fabricante e a literatura, os fluxos ideais possuem um valor elevado para o gás de deriva (EPC1) e um valor pouco elevado para o gás de arraste (EPC2).

O gás de deriva permite desacelerar os iões de acordo com o seu tamanho e forma, melhorando a sua separação.

O gás de arraste é aquele que transporta a amostra contida no *loop* através da coluna até ao IMS.

O aparelho permite fluxos para o gás de deriva entre 100 e 500 ml/min e entre 10 e 250 ml/min para o gás de arraste. Os valores que se revelaram óptimos foram 500 ml/min para EPC1 e 25 ml/min para EPC2.

Para determinar quanto tempo a válvula estaria aberta, teve-se por base o fluxo de gás de arraste e fez-se o cálculo para que todo o volume do *loop* (5ml) entrasse na coluna. O tempo de abertura da coluna é então 12 segundos.

Porém, sabe-se que um volume de amostra de 2 ml é, normalmente, suficiente para

realizar uma análise pelo que, para este caso, o tempo de abertura da válvula é 5 segundos. Experiências anteriores comprovaram que este valor era suficiente.

A bomba desliga no momento em que a válvula passa da Posição A para a posição B.

- Tempo de corrida

O tempo de corrida do modo de operação é determinado pelo utilizador consoante o que se pretende analisar. Para amostras desconhecidas é aconselhado um tempo de corrida de 5 ou 6 minutos.

Neste caso, o tempo de corrida escolhido foi 10 minutos porque, numa primeira análise, foram detectados picos após o tempo recomendado.

- Polaridade

Os testes realizados com o MCC-IMS foram todos elaborados na polaridade positiva porque esta se revelou mais apropriada para estas amostras, como se pode verificar pelas seguintes imagens:

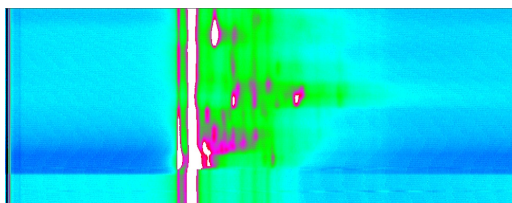


Figura 4.3: Espectro da análise da insulina em modo positivo. Imagem obtida em laboratório.

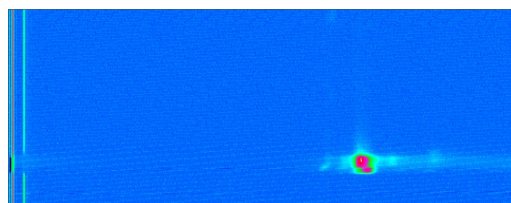


Figura 4.4: Espectro da análise da insulina em modo negativo. Imagem obtida em laboratório.

- Após cada análise, foi efectuada uma limpeza do sistema para garantir que nenhum composto da amostra analisada contamina a análise da próxima amostra.

O programa de limpeza utilizado fez passar o fluxo de gás de arraste pelo *loop* 5 vezes, por forma a que este eluísse todos os resíduos que aí pudessem ter ficado.

- Após a limpeza do sistema foi efectuada uma verificação de limpeza do mesmo. Esta verificação de limpeza consiste na obtenção de um espectro para aferir se ainda existem picos correspondentes a compostos ou se a limpeza foi efectuada com sucesso.

Uma nova limpeza é efectuada sempre que a primeira não tenha sido bem sucedida.

Nas primeiras análises efectuadas escolheram-se 40°C por ser uma temperatura próxima da temperatura do corpo humano, pelo que se garantia que não existiria destruição da matriz biológica da amostra. Porém, alterou-se o protocolo para 60°C porque se verificou, por experimentação, que não existia destruição nem do papel de recolha nem da matriz, sendo que a análise era mais bem conseguida a esta temperatura mais elevada.

4.2.4 Análise da insulina humana anidra Insulatard Penfill 100 IU/ml (Novo Nordisk)[®]

A análise da insulina foi levada a cabo com o propósito de verificar se existiam compostos presentes no *headspace* da lágrima que fossem coincidentes com compostos presentes no *headspace* da insulina.

A insulina analisada é obtida através da técnica de DNA recombinante a partir da *Saccharomyces cerevisiae* e cada cartucho injectável contém 10ml de insulina ou 1000 UI (Unidade Internacional), sendo que cada unidade UI corresponde a 0,035 mg de insulina humana anidra.

Recolheram-se, para um vial de 20 ml, 46UI de insulina, o que corresponde a um volume de 0,46ml e a uma massa de 1,61mg.

O protocolo utilizado para análise da insulina foi o mesmo que o protocolo utilizado para análise das amostras.

- Um vial com a amostra recolhida foi colocado a aquecer na placa de aquecimento analógica. O tempo de aquecimento foi 10 minutos e a temperatura de aquecimento foi 60°C.

O vial estava ligado ao MCC-IMS por intermédio da agulha, que se encontrava inserida no vial através do septo de silicone na tampa do mesmo.

- Durante os 10 minutos de aquecimento, dá-se o equilíbrio do *headspace* pelo que, neste caso, o tempo de equilíbrio é também 10 minutos.

- De seguida analisa-se a amostra através do programa EXP2_10MIN (já descrito anteriormente).



Resultados e Discussão

5.1 Aquisição de Dados - O Software LAV[®]

O MCC-IMS funciona em conjunto com um *software* de nome LAV[®], desenvolvido e registado pela empresa G.A.S, GmbH. Este *software* permite realizar uma interpretação e análise dos espectros obtidos pelo MCC-IMS. A versão utilizada durante a execução deste trabalho foi a versão 1.5.19.

O *software* grava o espectro, criando um ficheiro .mea por cada análise. O utilizador pode então visualizar a análise, sob a forma de um mapa de cores. Podem também visualizar-se simultaneamente diferentes espectros individuais.

O espectro individual (espectro de mobilidade) permite a visualização linha a linha, isto é, espectro a espectro. Este tipo de visualização utiliza-se quando se pretende obter um maior detalhe da altura ou do formato de um pico a um dado tempo de retenção, porque a cada espectro corresponde um tempo de retenção fixo, permitindo-se assim a análise do espectro ao longo do tempo de deriva.

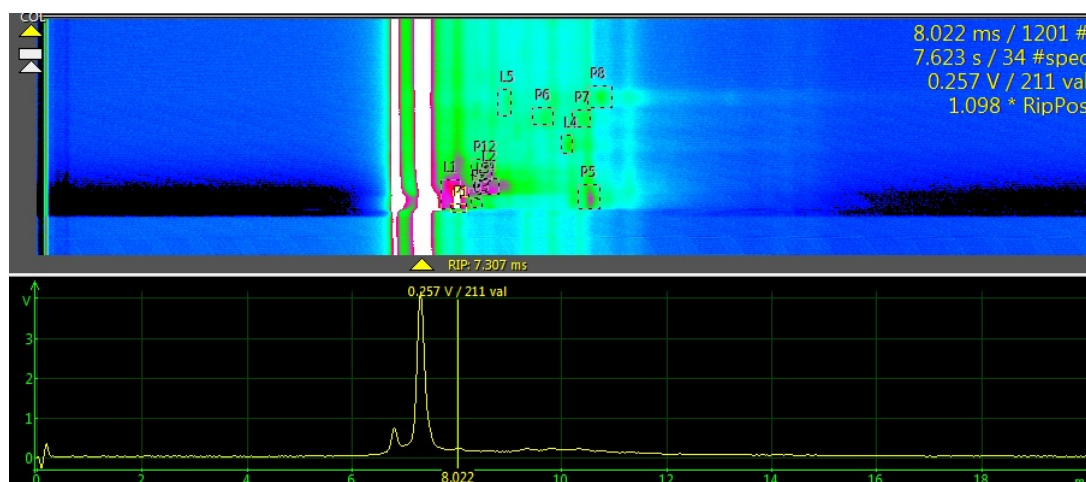


Figura 5.1: Visualização em simultâneo de um espectro (mapa de cores) e de um espectro individual correspondente ao spectra 34 (tempo de retenção de 7,623 segundos). Imagem obtida em laboratório.

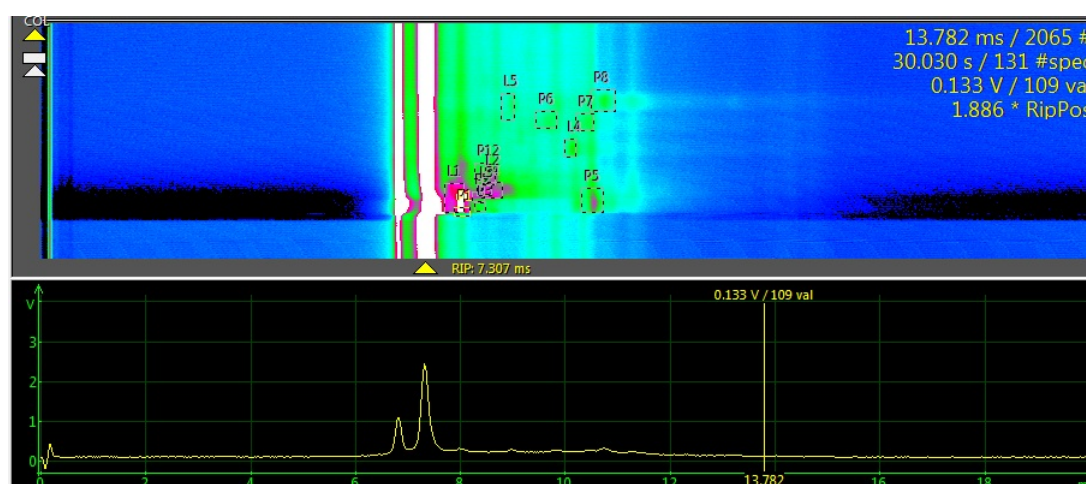


Figura 5.2: Visualização em simultâneo do mesmo espectro (mapa de cores) e de um espectro individual correspondente ao spectra 131 (tempo de retenção de 30,030 segundos). Imagem obtida em laboratório.

O tempo de deriva, representado em ambos os espectros no eixo dos xx está dividido em 3000 pontos. O tempo de retenção, representado no eixo dos yy é composto por um número de espectros individuais variável, que depende do tempo de corrida do modo de operação (neste caso, como o tempo de corrida é 10 minutos, o número de linhas correspondente é 2599).

Assim, um mapa de cor, pode ser visto como uma matriz de 2599 linhas por 3000 colunas, em que cada píxel possui a informação de um valor de intensidade (em Volts), que é traduzida para uma cor indo do preto para valores de intensidade negativos, passando pelo azul, variando para azul mais claro à medida que os valores de intensidade aumentam, passando para verde, rosa e vermelho (para valores de intensidade mais elevados) até atingir a cor branca que corresponde à intensidade máxima e saturação.

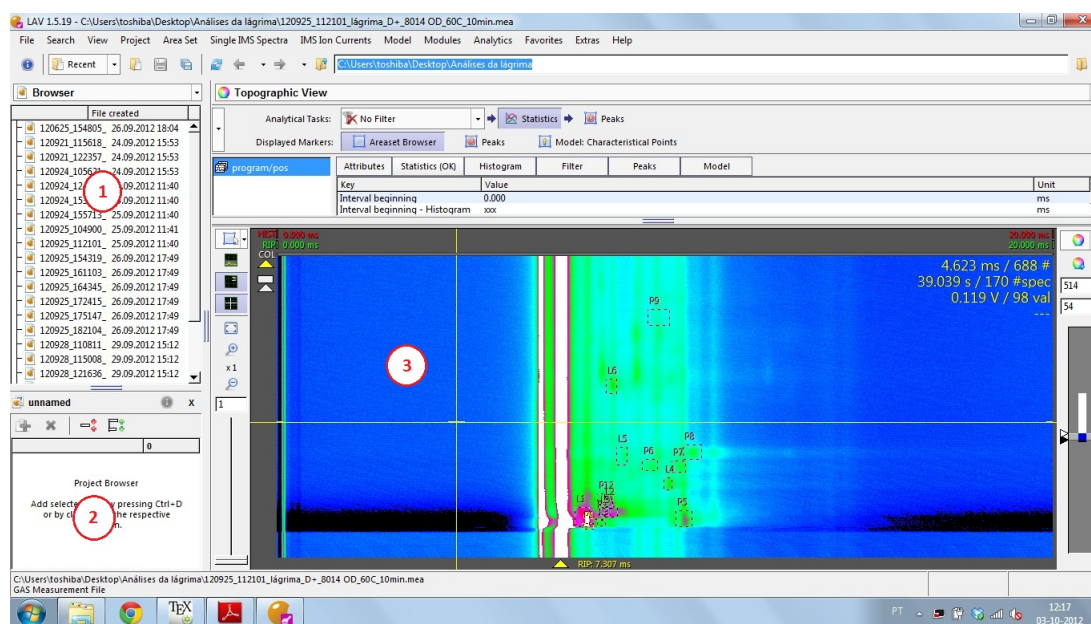


Figura 5.3: Janela do software LAV[®]. 1 - Menu que permite visualizar todos os ficheiros obtidos e guardados numa pasta, ficheiros de *AreaSet*, entre outras opções. 2 - Permite adicionar uma série de ficheiros desejados e guardá-los sob a forma de um projecto. 3 - Área de visualização do espectro obtido. Imagem obtida em laboratório.

O software LAV[®] possui uma ferramenta que permite seleccionar os picos observados no espectro, sendo possível atribuir-lhes uma designação. Essa ferramenta é denominada por *Areaset* e pode ser guardada sob a forma de um ficheiro com a terminação .las. Uma vez aberto, este ficheiro sobrepõe as áreas seleccionadas aos espectros dos ficheiros do tipo .mea, permitindo uma comparação visual entre os picos de espectros diferentes.

Depois de determinado o *Areaset*, pode ser utilizada outra ferramenta que executa a sua análise. No menu, seleccionando a função *Modules* surgem diferentes opções, entre as quais *Analyze Areaset*.

Com esta ferramenta obtêm-se dados sobre um conjunto de ficheiros .mea, como a intensidade dos seus picos, o seu tempo de deriva e retenção, entre outros. A utilização desta ferramenta necessita que se crie um projecto. Para tal, adicionam-se os ficheiros na janela de *Project Browser* e gravam-se esse ficheiros sob a forma de um projecto, que é apenas mais um ficheiro, do tipo .lprj, que contém todos os ficheiros .mea seleccionados. Por cada projecto analisado obtêm-se 13 ficheiros do tipo .csv, um ficheiro .pdf e um ficheiro do tipo .lmc, que é apenas um ficheiro de configuração. Estes ficheiros possuem as informações obtidas com o *Analyze Areaset*.

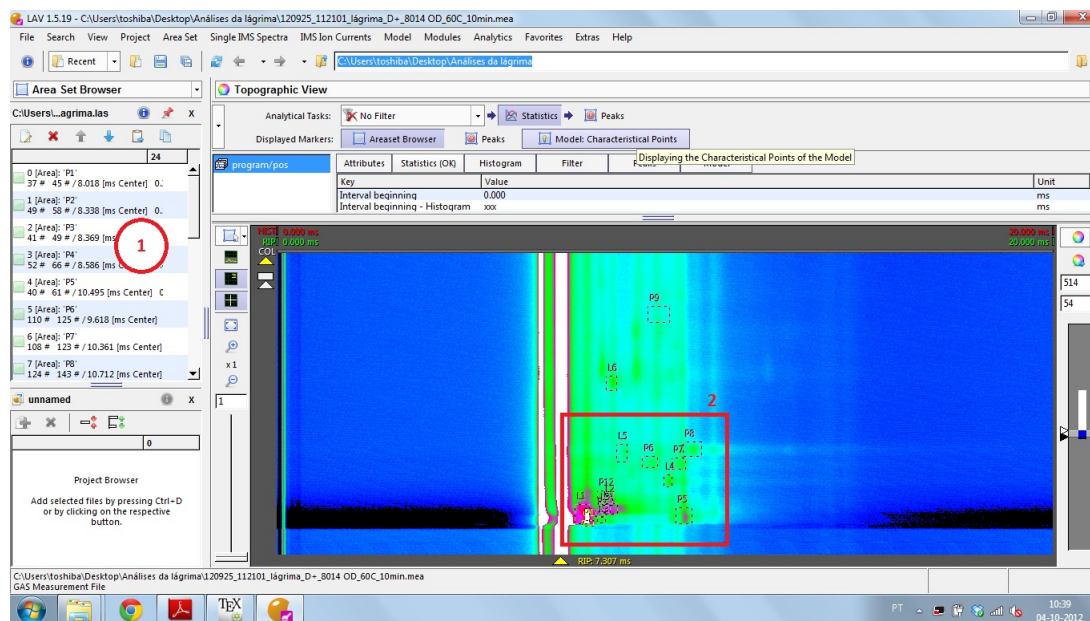


Figura 5.4: Imagem de um espectro de uma amostra e respectivo *Areaset*. 1 - Características de cada área seleccionada (nome, tempos de deriva de início e final e posição relativamente ao RIP. 2 - Espectro com *Areaset*

5.2 Definição da Matriz Biológica e Tratamento de Dados

5.2.1 Definição da Matriz Biológica

Os espectros visualizados continham picos que correspondiam apenas ao papel de recolha da amostra e picos que correspondiam à matriz biológica.

Desta forma, tornou-se necessário definir quais os picos que correspondiam apenas ao papel para que se pudesse definir a matriz biológica.

Assim sendo, observou-se o espectro que correspondia apenas à análise do papel e identificaram-se os picos presentes. Esses picos foram denominados por P^n sendo que n representa o número do pico e P o identifica como sendo do papel. Foram identificados 10 picos.

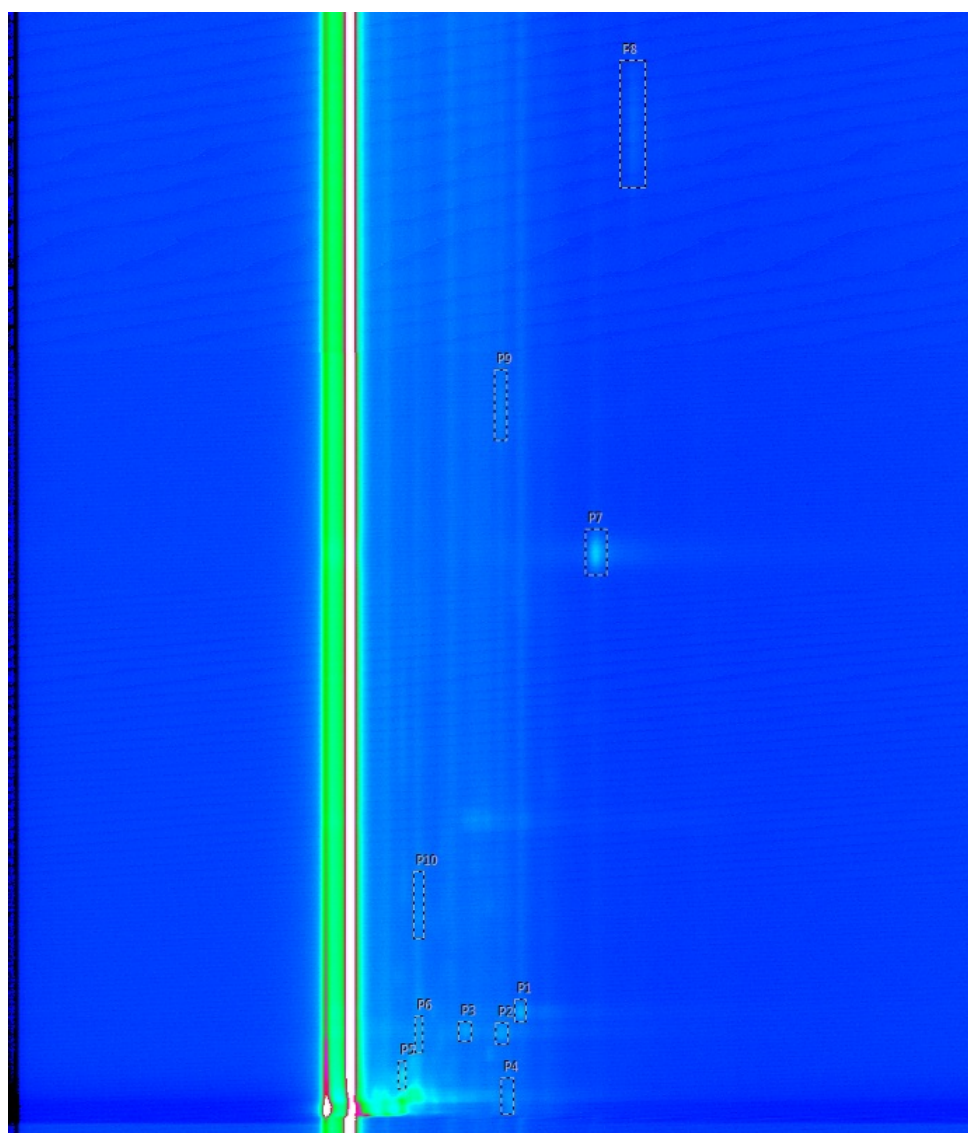


Figura 5.5: Espectro da análise do papel de recolha e respectivo *Areset*. Imagem obtida em laboratório.

De seguida, observaram-se os espectros de lágrima onde se identificaram os 10 picos do papel e mais 15 picos que se associaram a picos de lágrima e que foram denominados por L^n sendo que n representa o número do pico e L o identifica como sendo correspondente à lágrima definindo-se, assim, a matriz biológica.

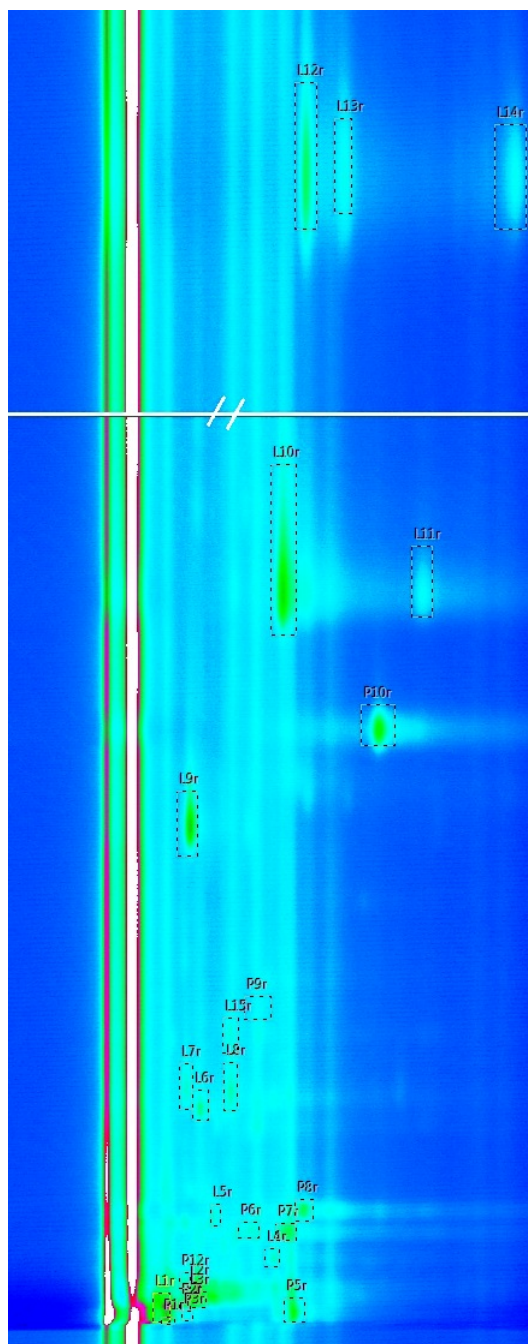


Figura 5.6: Espectro da análise de lágrima e respectivo *Areaset*. Imagem obtida em laboratório.

Determinaram-se os valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para cada pico da matriz biológica, sendo que os resultados se apresentam na tabela seguinte:

Tabela 5.1: Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos da matriz biológica

Picos	K_0	$1/K_0$	$t_d(\text{ms})$	$t_r(\text{s})$
L1	1,39	0,72	7,87	10,47
L2	1,27	0,79	8,62	15,67
L3	1,28	0,78	8,56	13,58
L4	1,09	0,92	10,09	21,79
L5	1,22	0,82	8,97	28,64
L6	1,26	0,79	8,67	49,98
L7	1,31	0,77	8,39	55,20
L8	1,19	0,84	9,24	53,24
L9	1,29	0,77	8,48	106,73
L10	1,06	0,94	10,32	152,05
L11	0,84	1,19	13,07	151,88
L12	1,02	0,98	10,78	432,62
L13	0,95	1,05	11,47	427,39
L14	0,74	1,36	14,88	428,76
L15	1,18	0,85	9,29	65,10

5.2.2 Avaliação do espectro da insulina

No espectro da insulina foram observados 28 picos, alguns dos quais também se mostraram presentes nos espectros das lágrimas.

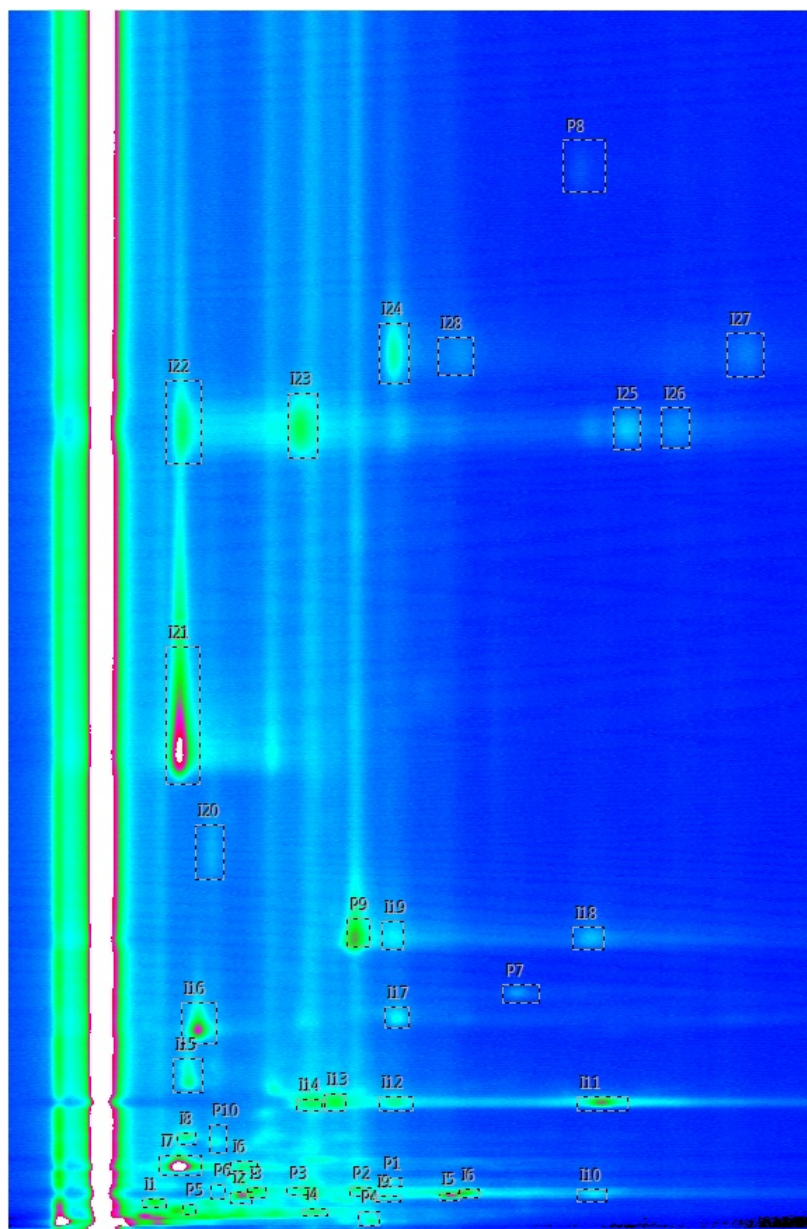


Figura 5.7: Espectro da análise da insulina e respectivo *Areaset*. Imagem obtida em laboratório.

Determinaram-se os valores da mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para cada pico.

Tabela 5.2: Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos da insulina

Picos	K_0	$1/K_0$	$t_d(\text{ms})$	$t_r(\text{s})$
I1	1,38	0,72	7,91	20,55
I2	1,22	0,81	8,94	23,56
I3	1,21	0,82	9,01	25,64
I4	1,11	0,89	9,79	16,40
I5	0,95	1,04	11,42	23,79
I6	0,95	1,05	11,51	25,17
I7	1,22	0,81	8,98	38,11
I8	1,33	0,74	8,20	52,66
I9	1,32	0,75	8,29	23,10
I10	1,02	0,97	10,66	24,02
I11	0,83	1,19	13,10	69,53
I12	0,82	1,20	13,20	69,99
I13	1,01	0,98	10,75	70,45
I14	1,12	0,89	9,76	69,069
I15	1,31	0,75	8,31	81,31
I16	1,29	0,76	8,44	106,72
I17	1,01	0,98	10,77	110,88
I18	0,83	1,19	13,06	151,30
I19	1,01	0,98	10,74	151,99
I20	1,27	0,78	8,61	194,50
I21	1,33	0,74	8,22	261,26
I22	1,33	0,75	8,24	394,31
I23	1,13	0,87	9,62	393,16
I24	1,01	0,98	10,74	427,11
I25	0,81	1,23	13,50	392,46
I26	0,77	1,28	14,10	392,70
I27	0,73	1,36	14,92	427,81
I28	0,94	1,05	11,56	428,73

5.2.3 Tratamento de Dados

Os dados recolhidos foram agrupados em 3 grupos, controlo, diabético (olho direito) e diabético (olho esquerdo). Cada um destes grupos originou um projecto.

Depois da criação do projecto, foi escolhido o *Areaset*. Este *Areaset* contém informação relativa aos picos que estão presentes na insulina e aos picos que estão presentes quando se analisou apenas a tira de papel de colheita.

Depois de escolhido o *Areaset* fez-se correr a função *Analyze Areaset* para analisar os vários projectos, obtendo-se assim informação acerca do tempo de deriva, tempo de retenção e valor de intensidade dos picos.

O tempo de deriva foi utilizado para o cálculo da mobilidade reduzida dos picos encontrados nas amostras de controlo e nas amostras de diabéticos.


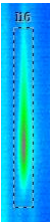




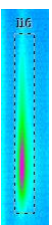



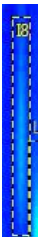
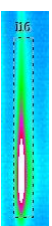
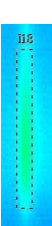

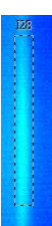
Com os valores de intensidade construíram-se gráficos que relacionam a evolução dos picos para o grupo de controlo e para o grupo de diabéticos, para uma posterior comparação. Este gráficos foram construídos com recurso ao *software Microsoft Office Excel*[®].

5.3 Resultados e Discussão de Resultados

Após a observação dos espectros dos 3 projectos criados, escolheram-se 5 picos que são visíveis tanto no espectro da insulina como nos restantes espectros.

Denominaram-se esses picos como I8, I16, I18, I27 e I28.

Tabela 5.3: Picos escolhidos para análise. Imagens obtidas em laboratório.

Group	Pico I8	Pico I16	Pico I18	Pico I27	Pico I28
Controlo					
Diabético (olho direito)					
Diabético (olho esquerdo)					

5.3.1 Cálculo dos valores de mobilidade reduzida

O cálculo da mobilidade reduzida foi efectuado tendo por base as seguintes equações:

$$K = \frac{l_d}{E \times t_{dcor}} \quad (5.1)$$

onde l_d representa o comprimento do tubo de deriva (5 cm), E representa a intensidade do campo eléctrico (400 V/cm) e t_{dcor} representa a correção do tempo de deriva e é dado por:

$$t_{dcor} = t_d - 0,5 \times \Delta\tau \quad (5.2)$$

onde t_d é o tempo de deriva e $\Delta\tau$ é o tempo de abertura da grelha (100 μ s).

A mobilidade reduzida é calculada a partir dos valores da mobilidade (K), através da seguinte expressão:

$$K_0 = K \left(\frac{P_d}{101} \right) \left(\frac{273}{T_d} \right) \quad (5.3)$$

onde P_d é a pressão no interior do tubo de deriva (101 kPa) e T_d representa a temperatura no interior do tubo de deriva (40°C).

K_0 é a mobilidade reduzida e a sua unidade é $cm^2 V^{-1} s^{-1}$.

Os valores que já se encontram substituídos na equação dizem respeito aos valores de P_0 e T_0 .

Nas tabelas seguintes, encontram-se os valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos seleccionados nos 3 projectos.

Tabela 5.4: Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de controlo

Pico	K_0	$1/K_0$	t_d (ms)	t_r (s)
I8	1,31	0,12	8,39	54,93
I16	1,29	0,77	8,46	106,72
I18	0,83	1,19	13,07	151,30
I27	0,73	1,35	14,85	427,81
I28	0,95	1,04	11,42	428,73

Tabela 5.5: Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de diabéticos (olho direito)

Pico	K_0	$1/K_0$	$t_d(\text{ms})$
I8	1,31	0,12	8,39
I16	1,29	0,77	8,47
I18	0,84	1,18	12,99
I27	0,73	1,36	14,90
I28	0,95	1,04	11,44

Tabela 5.6: Valores de mobilidade reduzida, tempo de deriva e tempo de retenção para os picos do grupo de diabéticos (olho esquerdo)

Pico	K_0	$1/K_0$	$t_d(\text{ms})$
I8	1,31	0,12	8,39
I16	1,29	0,77	8,48
I18	0,83	1,19	13,05
I27	0,73	1,36	14,92
I28	0,95	1,04	11,44

Pelos valores de mobilidade reduzida pode verificar-se que os compostos libertados pelos grupos analisados são os mesmos.

O tempo de retenção era igual para cada pico e cada grupo analisado, razão pela qual só é indicado na primeira tabela, o que também comprova que os compostos analisados são os mesmos.

Não se pode dizer a que composto corresponde cada pico, pois ainda não existem bibliotecas que permitam tal conclusão. Porém, caso existissem, os valores de tempo de retenção e de mobilidade reduzida seriam suficientes para identificar os compostos.

Verificou-se também que existiam picos do espectro de insulina que eram coincidentes com picos dos espectros da lágrima, pelo que foram esses os picos escolhidos para análise.

Foi comprovado pelos valores de mobilidade reduzida e de tempo de retenção que estes picos coincidentes correspondiam ao mesmo analito (presente na insulina e na lágrima).

5.3.2 Resultados em função da intensidade dos picos

5.3.2.1 Comparação entre o grupo de controlo e o grupo diabético

Aquando da criação do *Areaset*, verificaram-se algumas diferenças entre as intensidades dos picos nos espectros do grupo de diabéticos e nos espectros do grupo de controlo. Recorreu-se, assim, a gráficos de comparação dos valores de intensidade para verificar a situação. Para o grupo de controlo, utilizou-se a média dos valores de intensidade dos indivíduos para cada pico.

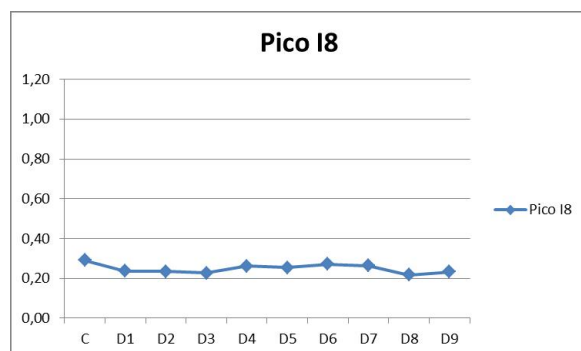


Figura 5.8: Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 (direito).

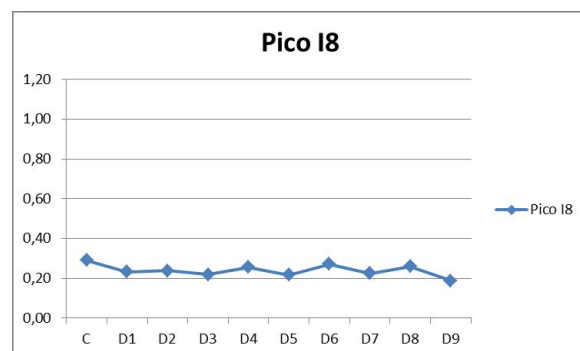


Figura 5.9: Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 (esquerdo).

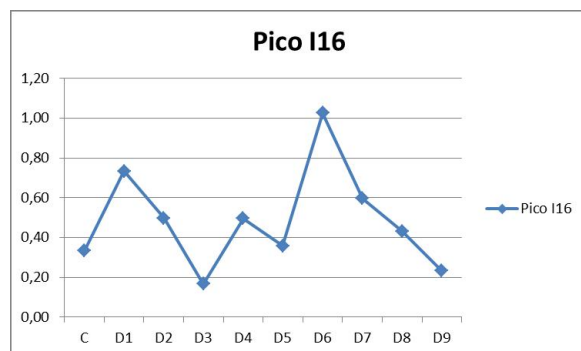


Figura 5.10: Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 (direito).

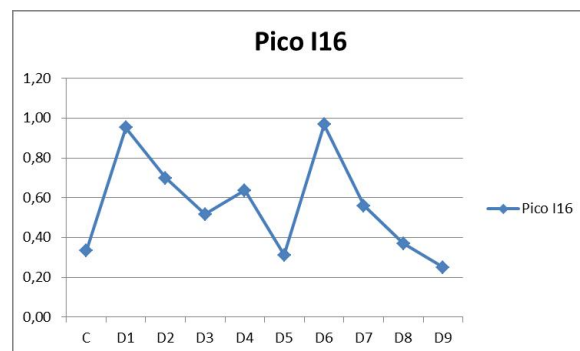


Figura 5.11: Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 (esquerdo).

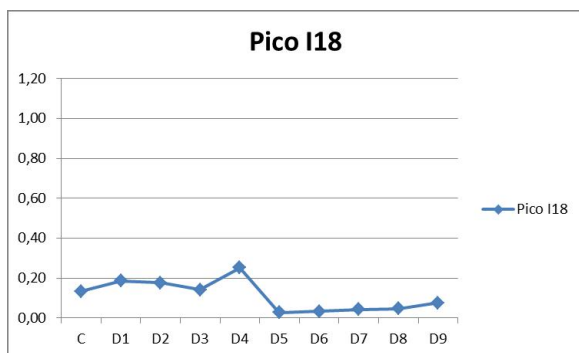


Figura 5.12: Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 (direito).

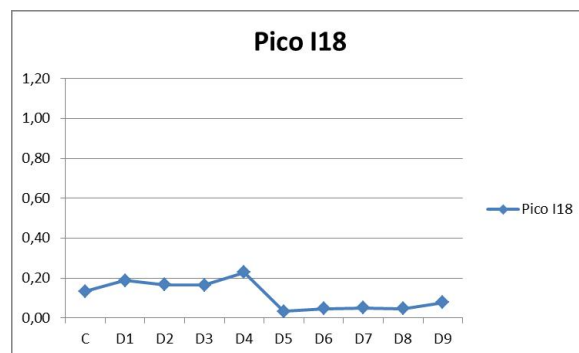


Figura 5.13: Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 (esquerdo).

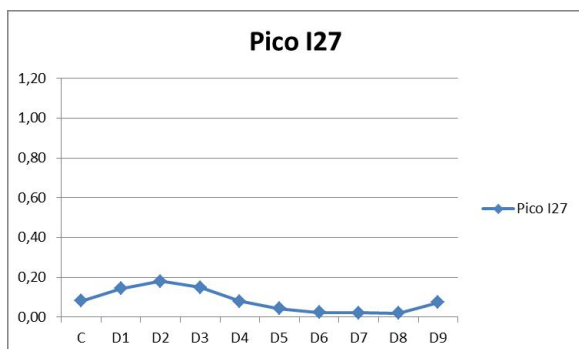


Figura 5.14: Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 (direito).

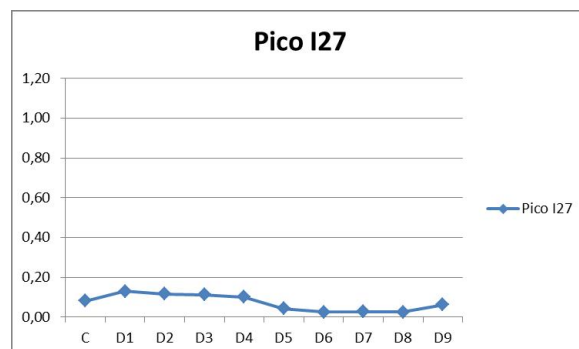


Figura 5.15: Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 (esquerdo).

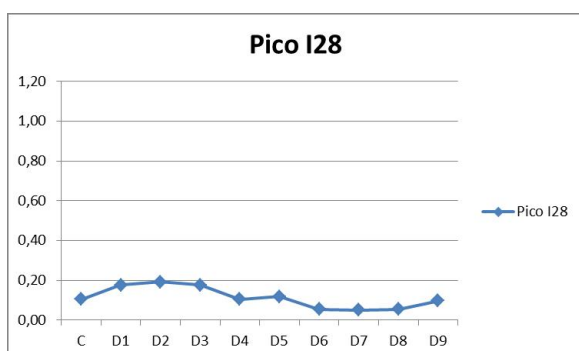


Figura 5.16: Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 (direito).

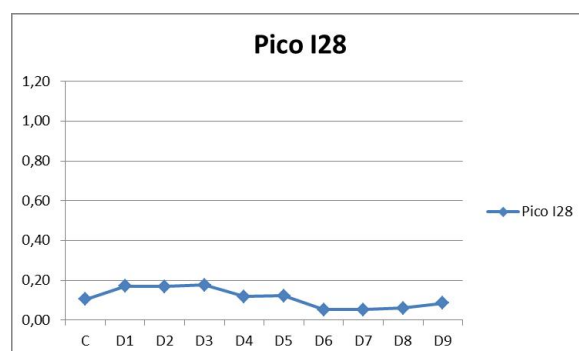


Figura 5.17: Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 (esquerdo).

O comportamento verificado em termos de intensidade foi semelhante para ambos os olhos, tal como seria de esperar, por se tratarem de amostras do mesmo paciente.

No pico I16, a maioria dos pacientes diabéticos apresenta intensidades do pico superiores à do grupo de controlo.

O mesmo já não se verifica no caso dos picos I8, I18 e I27, em que as intensidades dos picos dos indivíduos diabéticos são inferiores à do grupo de controlo.

No pico I28, verificou-se que a distribuição de intensidades do pico no grupo diabético é idêntica para intensidades superiores e inferiores à do grupo de controlo.

5.3.2.2 Comparação entre a intensidade dos picos do olho direito e do olho esquerdo

Outra abordagem que poderia demonstrar interesse era a comparação dos valores de intensidade dos mesmos picos entre olho esquerdo e direito, para averiguar se os compostos se apresentam mais intensos na lágrima de um dos olhos.

Assim sendo, construíram-se gráficos que relacionam a intensidade dos picos entre o olho direito e o olho esquerdo de cada indivíduo diabético.

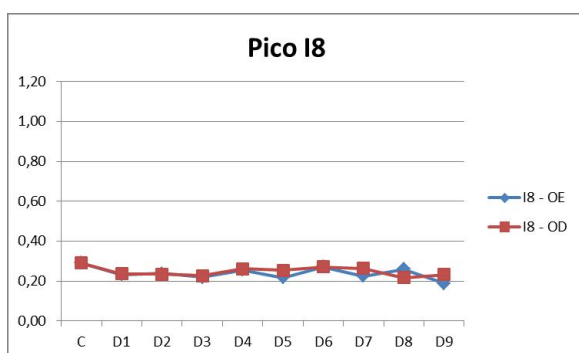


Figura 5.18: Gráfico de comparação da intensidade do pico I8 nos olhos esquerdo e direito.

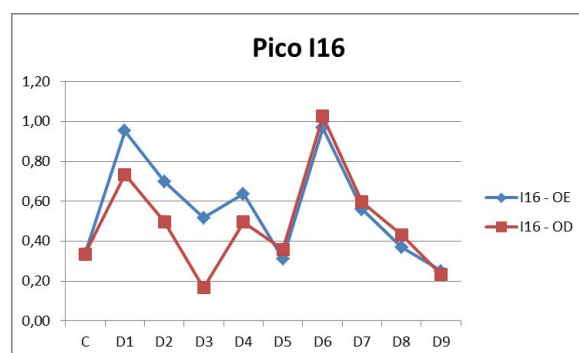


Figura 5.19: Gráfico de comparação da intensidade do pico I16 nos olhos esquerdo e direito.

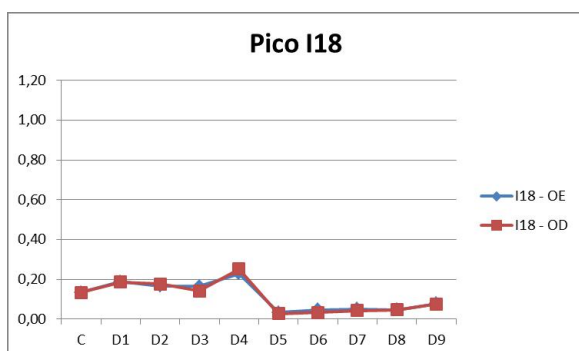


Figura 5.20: Gráfico de comparação da intensidade do pico I18 nos olhos esquerdo e direito.

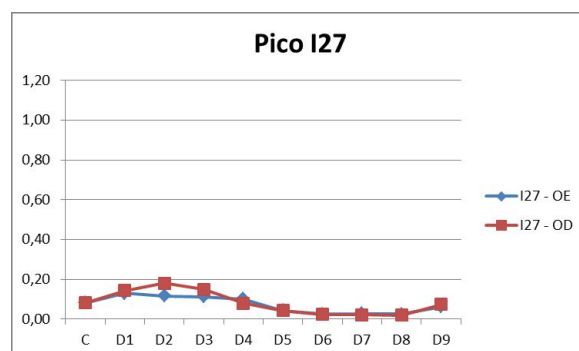


Figura 5.21: Gráfico de comparação da intensidade do pico I27 nos olhos esquerdo e direito.

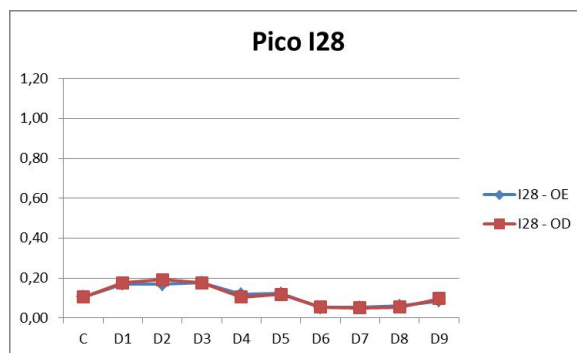


Figura 5.22: Gráfico de comparação da intensidade do pico I28 nos olhos esquerdo e direito.

Verificou-se que as intensidades medidas no olho direito e no olho esquerdo tinham curvas de tendência semelhantes, sendo os valores de intensidade muito próximos.

O cálculo da diferença percentual comprovará tal observação.

5.3.3 Diferença percentual entre as intensidades dos picos seleccionados

5.3.3.1 Diferença percentual entre o grupo de controlo e o grupo de diabéticos

Com o objectivo de avaliar as diferenças entre as intensidades dos picos seleccionados entre o grupo de diabéticos e o grupo de controlo efectuou-se o cálculo da diferença percentual.

$$D.P. = ([intensidade(diabetico) - intensidade(controlo)] / |intensidade(controlo)|) \times 100 \quad (5.4)$$

Os resultados obtidos foram os seguintes:

Tabela 5.7: Diferença percentual de intensidades para o pico I8

Paciente	Olho Direito	Olho Esquerdo
D1	-18,68	-20,06
D2	-19,03	-17,99
D3	-21,78	-24,89
D4	-9,72	-11,79
D5	-12,83	-25,57
D6	-6,62	-6,62
D7	-9,04	-22,82
D8	-25,23	-10,41
D9	-19,72	-35,22

Tabela 5.8: Diferença percentual de intensidades para o pico I16

Paciente	Olho Direito	Olho Esquerdo
D1	188,88	184,27
D2	48,41	108,43
D3	-50,43	54,08
D4	48,11	90,21
D5	6,90	-6,83
D6	206,37	189,05
D7	78,27	67,22
D8	29,00	10,48
D9	-30,42	-25,65

Tabela 5.9: Diferença percentual de intensidades para o pico I18

Paciente	Olho Direito	Olho Esquerdo
D1	39,50	40,25
D2	32,00	25,25
D3	5,75	23,75
D4	89,00	71,75
D5	-79,75	-74,50
D6	-75,25	-64,75
D7	-67,75	-62,50
D8	-65,50	-64,75
D9	-43,75	-42,25

Tabela 5.10: Diferença percentual de intensidades para o pico I27

Paciente	Olho Direito	Olho Esquerdo
D1	77,78	60,49
D2	123,46	44,44
D3	83,95	39,51
D4	-1,23	24,69
D5	-48,15	-48,15
D6	-70,37	-67,90
D7	-72,84	-66,67
D8	-76,57	-67,90
D9	-8,64	-22,22

Tabela 5.11: Diferença percentual de intensidades para o pico I28

Paciente	Olho Direito	Olho Esquerdo
D1	69,83	63,11
D2	83,26	61,19
D3	69,83	69,83
D4	0,75	13,22
D5	13,22	18,02
D6	-47,23	-50,11
D7	-52,03	-49,15
D8	-48,19	-42,43
D9	-6,93	-17,48

Verificou-se que, apesar de nem todos os picos se mostrarem mais intensos na análise da lágrima diabética comparativamente à análise da lágrima de controlo, as diferenças percentuais são consideráveis. Isto significa que a diferença de intensidades é significativa e a sua medição permite aferir acerca do estado metabólico do paciente em estudo.

Caso as diferenças percentuais se tivessem revelado semelhantes, tal não se poderia afirmar pois a medição de valores de intensidade muito próximos poderia não ter qualquer significado em termos de alterações metabólicas que se verificam entre o grupo de controlo e o grupo de diabéticos.

5.3.3.2 Diferença percentual entre olho direito e olho esquerdo

Como no caso anterior, existia interesse em verificar os valores de diferença percentual de intensidades dos picos entre os olhos direito e esquerdo.

Este interesse está relacionado com a criação de um dispositivo portátil, passível de ser utilizado por qualquer paciente. Neste caso, a análise não pode depender de um factor limitante como a escolha do olho a analisar, porque os dispositivos necessitam de ser simples assim como a metodologia a adoptar.

O factor de escolha de um dos olhos pode ser limitante principalmente para pacientes com idades mais avançadas, que têm dificuldades em reter tais informações.

As diferenças percentuais observadas foram as seguintes:

Tabela 5.12: Diferença percentual entre os olhos direito e esquerdo

Paciente	I8	I16	I18	I27	I28
D1	1,72	-23,00	-0,53	10,77	4,12
D2	-1,26	-66,33	5,39	54,70	13,69
D3	4,13	-67,83	-14,55	31,86	0,00
D4	2,34	-22,14	10,04	-20,79	-11,02
D5	17,13	14,74	-20,59	0,00	-4,07
D6	0,00	5,99	-29,79	-7,69	5,77
D7	17,86	6,61	-14,00	-18,52	-5,66
D8	-16,54	16,76	-2,13	-26,92	-10,00
D9	23,94	-6,43	-2,60	17,46	12,79

Nestas comparações verificou-se que, apesar de algumas discrepâncias, a intensidade dos picos dos compostos da lágrima de ambos os olhos é muito semelhante, podendo-se assim afirmar que é indiferente qual o olho em que se efectua a recolha da lágrima.

Na medida em que um dos objectivos futuros passará pela criação de um dispositivo passível de ser utilizado por qualquer paciente, esta observação é satisfatória uma vez que o processo autónomo de recolha e análise da lágrima por qualquer paciente se torna mais simples, por não existir uma exigência.

6

Conclusões

A análise da lágrima pode fornecer informações variadas e de extrema importância relativamente ao estado de saúde dos indivíduos. A sua análise ainda não faz parte da prática clínica corrente, uma vez que os métodos existentes actualmente ainda não são rápidos e de fácil utilização.

Ainda será necessário levar a cabo diversos estudos que identifiquem os compostos presentes na lágrima e que os relacionem com as diversas patologias clínicas.

Neste trabalho pretendeu-se compreender melhor a técnica de análise de metabolitos presentes no fluido lacrimal bem como desenvolver melhor a técnica com o objectivo de a aplicar ao diagnóstico da diabetes.

Conclui-se que existem picos presentes na insulina que são passíveis de observar na lágrima humana, tanto nos indivíduos diabéticos como nos indivíduos de controlo, nomeadamente os picos I16, I18, I21, I24, I27 e I28, que foram alvo de estudo. A diferenças entre os dois grupos (controlo e diabético) prenderam-se maioritariamente com a intensidade dos picos identificados.

Conclui-se também que não existem diferenças significativas entre as concentrações dos compostos presentes na lágrima do olho direito e do olho esquerdo, o que é importante quando se trata do desenvolvimento de um instrumento de análise que possa ser utilizado por qualquer paciente.

A utilização do MCC-IMS neste estudo permitiu a verificação da elevada sensibilidade deste instrumento na detecção de metabolitos que estão, na sua grande maioria, presentes na lágrima em concentrações muito baixas. Além disto, constatou-se que as análises são muito rápidas.

Verificou-se também que o aparelho é muito simples de manobrar, sendo bastante intuitivo e de fácil utilização.

A optimização de parâmetros necessita que sejam efectuados alguns cálculos, contudo estes cálculos também são simples e de rápida execução.

Os parâmetros escolhidos para este estudo revelaram-se adequados dado que os picos visualizados nos espectros eram claros e definidos.

Foi possível determinar os valores de mobilidade reduzida e tempo de retenção para os picos seleccionados, porém não foi possível identificar os compostos correspondentes através destes valores.

A quantificação dos compostos também não foi possível devido à inexistência de curvas de calibração. Porém, visualmente, a intensidade dos picos permite estimar a presença de maior ou menor quantidade de um determinado composto. Uma maior intensidade indica uma maior quantidade de um dado composto.

Apesar de todos estes obstáculos actuais, o MCC-IMS apresenta vantagens relativamente a outras técnicas na detecção, quantificação e identificação dos compostos.

De futuro, o MCC-IMS poderá ser vantajoso caso se criem bibliotecas de identificação dos compostos de forma a que este possa ser utilizado na detecção de um grande número de patologias que podem ser diagnosticadas através da análise dos compostos orgânicos voláteis e da sua variação.

Bibliografia

- [1] Ligor T. Jackowski M. Kłodzińska E. Szeliga J. Buszewski B., Ulanowska A. Identification of volatile organic compounds secreted from cancer tissues and bacterial cultures. *Journal of Chromatography B*, 868:88–94, 2008.
- [2] American Heart Association. Symptoms, diagnosis monitoring of diabetes, 2012.
- [3] Lei Zhou and Roger W Beuerman. Tear analysis in ocular surface diseases. *Progress in retinal and eye research*, null(null), June 2012.
- [4] G. A. Eiceman and Z. Karpas. *Ion Mobility Spectrometry*. Taylor and Francis Group, 2 edition, 2005.
- [5] Observatório Nacional da Obesidade e do Controlo do Peso. Dados estatísticos, 2012.
- [6] John P.H. Wilding. Pathophysiology and aetiology of obesity. *Medicine*, 39(1):6–10, January 2011.
- [7] M E Lean. Pathophysiology of obesity. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 59(3):331–6, August 2000.
- [8] Marià Alemany. Regulation of adipose tissue energy availability through blood flow control in the metabolic syndrome. *Free radical biology & medicine*, 52(10):2108–19, May 2012.
- [9] V. Moura and R. Monteiro. Papel do tecido adiposo na inflamação e metabolismo do doente obeso. *Revista da Sociedade Portuguesa d Ciências da Nutrição e Alimentação*, 16(1):15–22, 2010.
- [10] R. Francischi, L. Pereira, C. Freitas, Klopfer M., R. Santos, P. Vieira, and A. Lancha Júnior. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. *Revista Nutrição*, pages 17–28, Abril 2000.

- [11] Laurence Hoareau and Régis Roche. Palmitoylethanolamide, adipocytes and obesity-related inflammatory states. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*, 7(3-4):e205–e212, December 2010.
- [12] Angelo Avogaro and Saula Vigili de Kreutzenberg. Mechanisms of endothelial dysfunction in obesity. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 360(1-2):9–26, October 2005.
- [13] J. A. Esperança Pina. *Anatomia Humana dos Órgãos*. Lidel, 2 edition.
- [14] Encyclopaedia Britannica. Encyclopaedia britannica online, 2010.
- [15] Harold Ellis. Anatomy of the pancreas. *Surgery (Oxford)*, 25(2):72–73, February 2007.
- [16] John E. Hall. *Tratado de fisiología médica*. Elsevier España, 2011.
- [17] Nussey S. and Whitehead S. *Endocrinology: An integrated approach*, chapter 2 - The endocrine pancreas. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001.
- [18] *McGraw-Hill Concise Encyclopedia of Bioscience*. The McGraw-Hill Companies, Inc., 2002.
- [19] J. Berg, J. Tymoczko, and L. Stryer. *Biochemistry*. New York: W H Freeman, 2002.
- [20] *Textbook of diabetes*, chapter 1. Wiley - Blackwell, 4 edition, 2010.
- [21] Daily Med. Current medication information, 2010.
- [22] Gerald M. Reaven. Banting lecture 1988. *Nutrition*, 13(1):64, January 1997.
- [23] D R Matthews, J P Hosker, A S Rudenski, B A Naylor, D F Treacher, and R C Turner. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*, 28(7):412–9, July 1985.
- [24] Rita S Patarrão, W Wayne Lutt, Ricardo A Afonso, Rogério T Ribeiro, Maria P Guarino, Ana B Fernandes, José M Boavida, and M Paula Macedo. Meal-induced insulin sensitization and its parasympathetic regulation in humans. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 86(12):880–8, December 2008.
- [25] M F White and C R Kahn. The insulin signaling system. *The Journal of biological chemistry*, 269(1):1–4, January 1994.
- [26] Maria P Guarino, Nina C Correia, W Wayne Lutt, and M Paula Macedo. Insulin sensitivity is mediated by the activation of the ACh/NO/cGMP pathway in rat liver. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 287(3):G527–32, September 2004.

- [27] Consensus Development Conference on Insulin Resistance. 5-6 November 1997. American Diabetes Association. *Diabetes care*, 21(2):310–4, February 1998.
- [28] Organização Mundial de Saúde. Diabetes fact sheet nº 312, 2012.
- [29] Instituto Nacional de Estatística. 4º inquérito nacional de saúde. Technical report, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2007.
- [30] Mary Joyce Gan, Anastasia Albanese-O'Neill, and Michael J. Haller. Type 1 Diabetes: Current Concepts in Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Care, and Research. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*, 42(10):269–291, November 2012.
- [31] Henning Beck-Nielsen, Jan Erik Henriksen, Allan Vaag, and Ole Hother-Nielsen. Pathophysiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM). *Diabetes Research and Clinical Practice*, 28(null):S13–S25, January 1995.
- [32] Christopher J Nolan, Peter Damm, and Marc Prentki. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*, 378(9786):169–81, July 2011.
- [33] M Virally, J-F Blicklé, J Girard, S Halimi, D Simon, and P-J Guillausseau. Type 2 diabetes mellitus: epidemiology, pathophysiology, unmet needs and therapeutical perspectives. *Diabetes & metabolism*, 33(4):231–44, September 2007.
- [34] Phillippa J Miranda, Ralph A DeFronzo, Robert M Califf, and John R Guyton. Metabolic syndrome: definition, pathophysiology, and mechanisms. *American heart journal*, 149(1):33–45, January 2005.
- [35] TS Han and MEJ Lean. Metabolic Syndrome. *Medicine*, 31(4):27–31, April 2003.
- [36] M John Chapman and Andrei C Sposito. Hypertension and dyslipidaemia in obesity and insulin resistance: pathophysiology, impact on atherosclerotic disease and pharmacotherapy. *Pharmacology & therapeutics*, 117(3):354–73, March 2008.
- [37] Michael E Widlansky, Noyan Gokce, John F Keaney, and Joseph A Vita. The clinical implications of endothelial dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology*, 42(7):1149–1160, October 2003.
- [38] Eric J Belin de Chantemele and David W Stepp. Influence of obesity and metabolic dysfunction on the endothelial control in the coronary circulation. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(4):840–7, April 2012.
- [39] Angelo Avogaro, Saula Vigili de Kreutzenberg, and Gianpaolo Fadini. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes research and clinical practice*, 82 Suppl 2(null):S94–S101, December 2008.

- [40] Organização Mundial de Saúde. Diretrizes da oms para a tiragem de sangue: boas práticas em flebotomia.
- [41] Gustavo A de Souza, Lyris M F Godoy, and Matthias Mann. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome biology*, 7(8):R72, January 2006.
- [42] Richard Mayeux. Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2):182–8, April 2004.
- [43] O B Crofford, R E Mallard, R E Winton, N L Rogers, J C Jackson, and U Keller. Acetone in breath and blood. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, 88:128–39, January 1977.
- [44] James B Meigs, Frank B Hu, Nader Rifai, and JoAnn E Manson. Biomarkers of endothelial dysfunction and risk of type 2 diabetes mellitus. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 291(16):1978–86, April 2004.
- [45] Veikko Salomaa, Aki Havulinna, Olli Saarela, Tanja Zeller, Pekka Jousilahti, Antti Jula, Thomas Muenzel, Arpo Aromaa, Alun Evans, Kari Kuulasmaa, and Stefan Blankenberg. Thirty-one novel biomarkers as predictors for clinically incident diabetes. *PloS one*, 5(4):e10100, January 2010.
- [46] J Stach and J I Baumbach. Ion Mobility Spectrometry - Basic Elements and Applications. pages 1–21, 2002.
- [47] W Vautz, D Zimmermann, M Hartmann, J I Baumbach, J Nolte, and J Jung. Ion mobility spectrometry for food quality and safety. *Food additives and contaminants*, 23(11):1064–73, November 2006.
- [48] G.A.S GmbH. Apresentação g.a.s. Outubro 2010.
- [49] J I Baumbach. Process analysis using ion mobility spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 384(5):1059–70, March 2006.
- [50] Jörg Ingo Baumbach, Stefanie Sielemann, Zhiyong Xie, and Hartwig Schmidt. Detection of the gasoline components methyl tert-butyl ether, benzene, toluene, and m-xylene using ion mobility spectrometers with a radioactive and UV ionization source. *Analytical chemistry*, 75(6):1483–90, March 2003.
- [51] M Mäkinen, M Sillanpää, A-K Viitanen, A Knap, J M Mäkelä, and J Puton. The effect of humidity on sensitivity of amine detection in ion mobility spectrometry. *Talanta*, 84(1):116–21, March 2011.
- [52] GmbH G.A.S. *MCC-IMS User's Manual*, 2010.
- [53] Eric Stauffer, Julia A. Dolan, and Reta Newman. *Fire Debris Analysis (Google eBook)*. Academic Press, 2007.

- [54] UC Davis. Gas chromatography, 2011.
- [55] Robert S. Blake, Paul S. Monks, and Andrew M. Ellis. ChemInform Abstract: Proton-Transfer Reaction Mass Spectrometry. *ChemInform*, 40(23), June 2009.
- [56] P Španel and D Smith. Selected ion flow tube: a technique for quantitative trace gas analysis of air and breath. *Medical & biological engineering & computing*, 34(6):409–19, November 1996.
- [57] David Smith and Patrik Španěl. Direct, rapid quantitative analyses of BVOCs using SIFT-MS and PTR-MS obviating sample collection. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7):945–959, July 2011.
- [58] R. Seeley, T. Stephens, and P. Tate. *Anatomia e Fisiologia*. McGraw-Hill, 2003.



Anexo 1



Consentimento informado

Eu, Mónica Silva, aluna de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica, venho por este meio solicitar a sua colaboração para o desenvolvimento da minha tese de Mestrado intitulada *“Estudo e Desenvolvimento do método de detecção de metabolitos no fluido lacrimal por MCC-IMS”*.

Este projecto é conduzido na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, contando com a colaboração da empresa NMT – Tecnologia, Inovação e Consultoria, Lda., sob orientação da professora Valentina Vassilenko e co-orientação do Professor João O'Neill, professor catedrático de Anatomia e Director do Departamento de Anatomia da Faculdade de Ciências Médicas, UNL e tem como principal objectivo a medição e avaliação dos compostos orgânicos voláteis do fluido lacrimal para estudo da sua correlação com a desregulação da glicémia.

Para tal, apenas é solicitado ao colaborador/voluntário que permita a recolha da sua lágrima, sendo por isso uma recolha rápida, não-invasiva nem cruenta, sem esforço por parte do mesmo e sem qualquer risco físico ou emocional.

A sua colaboração é de grande importância e não existem quaisquer prejuízos ou gastos com a sua participação, podendo desistir em qualquer momento do protocolo. Os seus dados não serão divulgados nem utilizados para nenhum outro propósito que não o deste estudo, sem a sua prévia anuência.

Agradecemos a sua colaboração.

Eu, abaixo assinado, depois de ler e ter esclarecido todas as minhas dúvidas, aceito doar a minha lágrima com efeitos de investigação científica para o projecto *“Estudo e Desenvolvimento do método de detecção de metabolitos no fluido lacrimal por MCC-IMS”*.

Data _____

Nome _____

BI _____

Assinatura _____



Anexo 2



Folha de Registos – Paciente

Idade: _____ anos	
Sexo: Feminino	<input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/>
É fumador? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Sofre de hipertensão arterial? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Sofre doenças coronárias/cardiovasculares? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Tem diabetes? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Tem colesterol? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Toma medicamentos? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Quais ou para quê?
Toma substâncias hormonais? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Pratica desporto? Sim	<input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

Antecedentes:
Hipertensão: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Diabetes: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Doenças coronárias/cardiovasculares: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>
Colesterol: Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/>

Medidas
Altura: _____ cm
Peso: _____ kg
IMC: _____



Anexo 3

Protocolo Experimental

- Um vial com a amostra recolhida foi colocado a aquecer na placa de aquecimento analógica. O tempo de aquecimento foi 10 minutos e a temperatura de aquecimento foi 60°C.

O vial estava ligado ao MCC-IMS por intermédio da agulha, que se encontrava inserida no vial através do septo de silicone na tampa do mesmo.

- Durante os 10 minutos de aquecimento, dá-se o equilíbrio do *headspace* pelo que, neste caso, o tempo de equilíbrio é também 10 minutos.

- De seguida, analisam-se os compostos voláteis da amostra. O programa para análise do *headspace* da amostra de lágrima tem o nome de EXP2_10MIN.

- Após cada análise, foi efectuada uma limpeza do sistema para garantir que nenhum composto da amostra analisada contamina a análise da próxima amostra.

O programa de limpeza utilizado fez passar o fluxo de gás de arraste pelo *loop* 5 vezes, por forma a que este eluísse todos os resíduos que aí pudessem ter ficado.

- Após a limpeza do sistema foi efectuada uma verificação de limpeza do mesmo. Esta verificação de limpeza consiste na obtenção de um espectro para aferir se ainda existem picos correspondentes a compostos ou se a limpeza foi efectuada com sucesso.

Uma nova limpeza é efectuada sempre que a primeira não tenha sido bem sucedida.